

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE D

WO 9605863A1

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 47/48, 49/00 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 96/05863 |
| | | (43) Date de publication internationale: 29 février 1996 (29.02.96) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE95/00076 (22) Date de dépôt international: 21 août 1995 (21.08.95) | | (81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). |
| (30) Données relatives à la priorité: 9400752 19 août 1994 (19.08.94) BE 9400751 19 août 1994 (19.08.94) BE | | |
| (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): LA REGION WALLONNE [BE/BE]; Square du Bastion 1A, B-1050 Bruxelles (BE). UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN [BE/BE]; Halles universitaires, Place de l'Université 1, B-1080 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TROUET, André [BE/BE]; Predikherenstraat 29, B-3020 Herent (BE). BAURAIN, Roger [BE/BE]; Avenue des Violettes 72, B-1970 Wezembeek-Oppem (BE). (74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1080 Bruxelles (BE). | | |

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

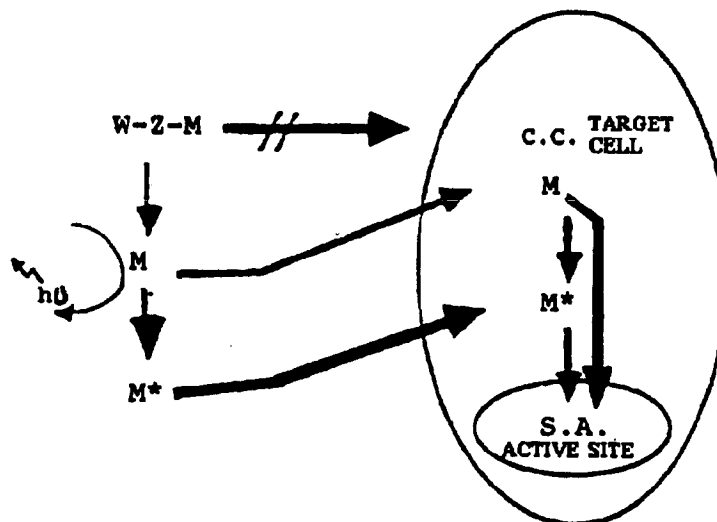
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: COMPOUNDS, PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND DIAGNOSTIC DEVICE COMPRISING SAME AND THEIR USE

(54) Titre: COMPOSES, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE ET DISPOSITIF DE DIAGNOSTIC LES COMPRENANT ET LEUR UTILISATION

(57) Abstract

The compound (W-Z-M) of the invention comprises an element (M) selected from the group consisting of markers and therapeutic agents having an intracellular active site (S.A.), linked to a ligand (W-Z) that comprises an arm (Z) linked to a terminal grouping (W). The compound is characterized in that the binding between the arm (Z) of the ligand (W-Z) and the element (M) prevents the compound (W-Z-M) from penetrating within the cells and/or inhibits expression of the marker (M). The invention is also characterized in that this binding is selectively separable by factors secreted by target cells so as to enable the marker (M) to be expressed in the target cells or the therapeutic agent (M) to penetrate therein, and in that the terminal grouping (W) ensures that the compound (W-Z-M) is stable in serum and circulating blood.



Inventor: Dubois, et al.
Serial No.: 09/879,442
Docket No. COUL-015/02US
F14

(57) Abrégé

Le composé (W-Z-M) selon l'invention comprend un élément (M) choisi parmi le groupe constitué par les marqueurs et les agents thérapeutiques possédant un site actif intracellulaire (S.A.), lié à un ligand (W-Z), comprenant un bras (Z) lié à un groupement terminal (W), caractérisé en ce que la liaison entre le bras (Z) du ligand (W-Z) et l'élément (M) empêche la pénétration intracellulaire du composé (W-Z-M) et/ou inhibe l'expression du marqueur (M), en ce que ladite liaison est clivable sélectivement par des facteurs sécrétés par des cellules cibles de manière à permettre l'expression du marqueur (M) ou la pénétration de l'agent thérapeutique (M) dans lesdites cellules cibles, et en ce que le groupement terminal (W) assure la stabilité du composé (W-Z-M) dans le sérum et le sang circulant.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | GB | Royaume-Uni | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GE | Géorgie | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GN | Guinée | NE | Niger |
| BE | Belgique | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BF | Burkina Faso | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BG | Bulgarie | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BJ | Bénin | IT | Italie | PL | Pologne |
| BR | Bésil | JP | Japon | PT | Portugal |
| BY | Bélarus | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| CA | Canada | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroon | LK | Sri Lanka | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LV | Lettonie | TG | Togo |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DE | Allemagne | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| DK | Danemark | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | UZ | Ouzbékistan |
| FR | France | | | VN | Viet Nam |
| GA | Gabon | | | | |

5

10 COMPOSES, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE ET DISPOSITIF DE
DIAGNOSTIC LES COMPRENANT ET LEUR UTILISATION.

Objet de l'invention.

La présente invention concerne des nouveaux
15 composés, la composition pharmaceutique et le dispositif de
diagnostic les comprenant et l'utilisation de ceux-ci pour
la préparation de médicaments destinés au traitement et/ou
pour le diagnostic de tumeurs cancéreuses et/ou de réactions
inflammatoires.

20 Etat de la technique et arrière-plan technologique à la base
de l'invention.

De nombreux agents tumoraux, tels que les
anthracyclines et les alcaloïdes vinca, ont été développés
ces dernières années et sont particulièrement efficaces pour
25 le traitement des cancers. Cependant, ces molécules sont
souvent caractérisées in vivo par une toxicité aiguë, en
particulier une toxicité médullaire et muqueuse ainsi qu'une
toxicité chronique cardiaque chez les anthracyclines et
neurologique chez les alcaloïdes vinca.

30 Aussi, on a cherché à développer des agents
antitumoraux plus spécifiques, de manière à ce qu'ils soient
plus efficaces contre les cellules tumorales, et par
conséquent, à diminuer les effets secondaires de ces produits
(toxicité, destruction de cellules non tumorales, ...).

35

Le brevet US-4,296,105 décrit des dérivés de doxorubicine liés à un acide aminé, éventuellement substitué, qui possèdent in vitro une activité antitumorale plus élevée et une toxicité plus faible que la doxorubicine.

5 Cependant, comme ces dérivés ont un site d'action intracellulaire, ces molécules sont encore susceptibles de pénétrer dans les cellules tumorales et dans les cellules normales.

Aussi, ces dernières années, de nouveaux agents
10 thérapeutiques ont été proposés sous forme de prodrogues.

Les prodrogues sont des molécules susceptibles de se transformer en drogues (composés thérapeutiques actifs) par certaines modifications chimiques ou enzymatiques de leur structure.

15 Cependant, ces prodrogues sont également caractérisées par une faible stabilité dans le sang et le sérum, qui comportent des enzymes qui inactivent ces molécules.

Les documents Chemical Abstract 97:150635, Journal
20 of Medicinal Chemistry, Vol. 23, pp. 1171-1174 (1980); Drugs Exp. Clin., Vol. 9, pp. 303-311 (1983); Journal of Medical Chemistry, Vol. 23, pp. 1166-1170 (1980) et la demande de brevet BE-882.541 décrivent des prodrogues comprenant un vecteur lié par un bras peptidique à la drogue. De
25 préférence, le bras est constitué de quatre amino-acides et est lié par sa fonction carboxylique libre à la fonction amine libre de dérivés d'anthracyclines telles que la daunorubicine.

En outre, le bras de ces prodrogues est lié par sa
30 fonction amine libre à un vecteur constitué d'une macromolécule (protéine telle que la BSA, des immunoglobulines, ...) qui permet l'endocytose sélective de la prodrogue par des cellules cibles.

Il est également connu que le méthotrexate peut
35 être utilisé pour le traitement de réactions inflammatoires telles que les rhumatismes, mais sa toxicité élevée limite

ses applications.

Buts de l'invention.

La présente invention vise à fournir de nouveaux composés comprenant un agent thérapeutique antitumoral ou un marqueur, en particulier des prodrogues comprenant un agent thérapeutique antitumoral, présentant des propriétés thérapeutiques améliorées par rapport aux produits de l'état de la technique, en particulier des propriétés thérapeutiques améliorées dans le traitement des tumeurs cancéreuses et/ou dans le traitement des réactions inflammatoires telles que les rhumatismes.

Un but particulier de la présente invention vise à obtenir des prodrogues qui présentent une spécificité d'action élevée, une toxicité réduite et une stabilité améliorée dans le sérum et le sang.

Un but complémentaire de la présente invention vise à obtenir des composés comprenant un marqueur permettant de caractériser des tumeurs (diagnostic, évolution de la tumeur, dosage des facteurs sécrétés par les cellules tumorales, ...).

Éléments caractéristiques de la présente invention.

La présente invention concerne des composés (W-Z-M) comprenant un élément choisi parmi le groupe constitué par les marqueurs et les agents thérapeutiques, de préférence antitumoraux et/ou anti-inflammatoires, possédant un site actif intracellulaire (S.A.), lié à un ligand (W-Z) comprenant un bras (Z) lié à un groupement terminal (W) dans lequel la liaison entre le bras (Z) du ligand (W-Z) et l'élément (M) empêche la pénétration cellulaire du composé (W-Z-M) et/ou inhibe l'expression du marqueur (M); dans lequel cette liaison est clivable sélectivement par des facteurs sécrétés par des cellules cibles, de manière à permettre l'expression du marqueur (M) et/ou la pénétration de l'agent thérapeutique (M) dans lesdites cellules cibles, et dans lequel le groupement terminal (W) assure la stabilité du composé (W-Z-M) dans le sérum et dans le sang circulant.

On entend par facteurs sécrétés par des cellules cibles, en particulier par des cellules tumorales et des cellules impliquées dans les réactions inflammatoires (macrophages, monocytes, ...), des enzymes telles que des protéases ou peptidases, sécrétées de manière spécifique dans le milieu extracellulaire par lesdites cellules.

Ces enzymes sont donc susceptibles de cliver sélectivement la liaison existant entre l'élément (M) et le bras (Z) du ligand (W-Z) de manière à permettre l'expression du marqueur, avantageusement dans l'environnement desdites cellules et/ou la pénétration de l'agent thérapeutique, préférentiellement dans lesdites cellules, et d'assurer de cette manière leur destruction et/ou de bloquer leur prolifération.

La liaison entre le groupement terminal (W) et le bras (Z) ainsi que la liaison entre le bras (Z) et l'élément (M) peuvent être tout type de liaison covalente, n'affectant pas les propriétés du composé (W-Z-M) selon l'invention.

On entend par liaison entre le bras (Z) du ligand (W-Z) et le marqueur (M) inhibant l'expression du marqueur (M), toute liaison covalente empêchant la détection et/ou la quantification du marqueur (M).

L'expression du marqueur (M) libre peut être détectée par tout procédé ou dispositif bien connu de l'Homme du Métier, par exemple par détection par coloration, fluorescence, bioluminescence, chemoluminescence, ... impliquant éventuellement un ou plusieurs réactifs intermédiaires.

De préférence, ledit marqueur est choisi parmi le groupe constitué par la coumarine, la 7-amido-4-trifluorométhyle coumarine, la paranitroanilide (qui peut être caractérisée sous sa forme libre par colorimétrie après réaction de diazotation), la β -naphtylamide et la 4-méthoxy- β -naphtylamide, et est susceptible d'être détecté par fluorescence lorsqu'il n'est plus lié au ligand (W-Z).

On entend par groupement terminal (W) assurant la stabilité du composé selon l'invention dans le sérum et dans le sang circulant, tout groupement qui réduit ou inhibe le clivage du composé selon l'invention dans le sérum et le sang circulant, en particulier qui réduit ou inhibe l'hydrolyse du composé selon l'invention par des protéinases et peptidases présentes dans le sérum et/ou le sang circulant, en particulier les peptidases et protéinases associées aux globules rouges.

En particulier, un groupement terminal (W) assure la stabilité du composé selon l'invention lorsque moins de 20%, de préférence moins de 2%, du composé est clivé par lesdites enzymes pendant sa conservation dans du sang humain à 37°C pendant plus de 2 heures.

De préférence, ce groupement terminal (W) est choisi parmi le groupe constitué par les acides aminés non présents chez les mammifères (c'est-à-dire les acides aminés non encodables génétiquement par les mammifères) ou un groupement succinyl.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le groupement (W) est la β -Alanine de formule : $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, lié par sa fonction carboxylique au bras (Z).

Le bras (Z) peut être constitué par toute structure chimique (polysaccharides, peptides, ...) dont la liaison à l'élément (M) est susceptible d'être clivée sélectivement par les facteurs sécrétés par les cellules cibles de manière à permettre l'expression du marqueur (M) dans l'environnement desdites cellules et/ou la pénétration de l'agent thérapeutique (M) préférentiellement dans lesdites cellules.

Selon l'invention, la liaison entre l'élément (M) et le bras (Z) du ligand (W-Z) consiste en un lien peptidique. De préférence, le bras (Z) est un peptide constitué d'au moins deux acides aminés éventuellement substitués.

Le bras (Z) du ligand (W-Z) est constitué de

préférence par la succession des acides aminés suivants : L-Leucyl-L-Alanyl-L-Leucyl, L-Leucyl-L-Alanyl ou L-Alanyl-L-Leucyl-L-Phénylalanine ou L-Alanyl-L-Leucyl, liés par leur fonction carboxylique à l'élément (M).

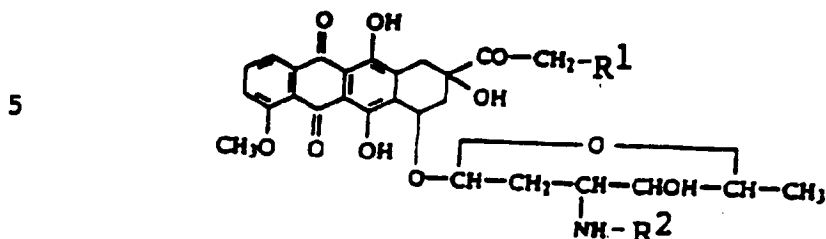
- 5 Selon l'invention, l'agent thérapeutique (M) est soit un agent thérapeutique utilisé en chimiothérapie du cancer, de préférence choisi parmi les agents thérapeutiques décrits par Bruce A. Chabner et Jerry M. Collins (Cancer Chemotherapy, Lippincott Ed., ISBN 0-397-50900-6 (1990)),
- 10 soit un anti-inflammatoire tel que le méthotrexate; et susceptible de se fixer au ligand (W-Z), de préférence par un lien peptidique au groupement (Z) du ligand (W-Z).

- En particulier, l'agent thérapeutique est choisi parmi le groupe constitué par les anthracyclines, les dérivés
- 15 d'acide folique, les alcaloïdes vinca, le mitoxanthrone, la calichéamycine, le cytosine arabinoside (ARA-C), l'adénosine arabinoside (ARA-A), le fludarabine phosphate, le melphalan, la bléomycine, la mitomycine, la L-canavanine, les taxoïdes, la camptothécine et leurs dérivés, en particulier le
- 20 TOPOTECAN ® (hydrochlorure de 9-diméthylaminométhyle-10-hydroxy camptothécine), les dérivés de fluorochromes, tels que la rhodamine 123 et ses dérivés, en particulier les isothiocyanates de rhodamine, éventuellement liés à un acide aminé substitué ou non. La substitution sur l'acide aminé
- 25 peut être toute substitution n'affectant pas les propriétés du composé (W-Z-M) selon l'invention.

- On entend par dérivés de ces molécules, lesdites molécules modifiées par un groupement chimique permettant leur fixation au bras (Z) du ligand (W-Z) par un lien
- 30 covalent qui n'affecte pas l'activité thérapeutique de la molécule originale.

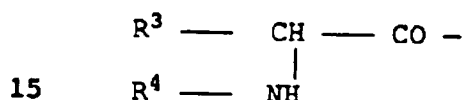
- De préférence, dans le composé selon l'invention, l'agent thérapeutique (M) est choisi parmi le groupe des anthracyclines, en particulier la doxorubicine (DOX) et la
- 35 daunorubicine (DNR), éventuellement liées à un acide aminé substitué ou non.

Avantageusement, l'agent thérapeutique correspond à la formule générale :



dans laquelle :

- 10 - R¹ est un atome d'hydrogène ou un groupement OH,
 - R² est un atome d'hydrogène ou un radical de formule

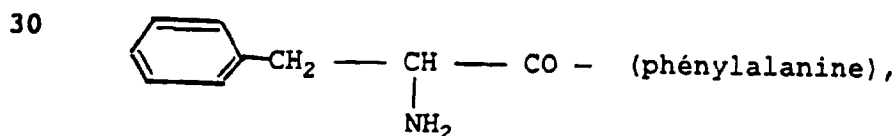
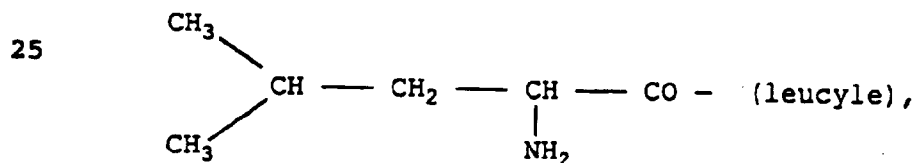


dans laquelle :

- R³ est un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, éventuellement substitué,

- 20 - R⁴ représente un atome d'hydrogène ou forme avec R³ un radical alkylène comportant 3 ou 4 atomes de carbone.

De préférence, R² est un radical de formule :



35 ou un de leurs isomères.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le composé est la β Alanyl-L-Leucyl-L-Alanyl-L-Leucyl-daunorubicine (identifiée par β Ala-Leu-Ala-Leu-DNR partout ci-dessous), la β Alanyl-L-Leucyl-L-Alanyl-L-Leucyl-doxorubicine (identifiée par β Ala-Leu-Ala-Leu-DOX partout ci-dessous), la β Alanyl-L-Alanyl-L-Leucyl-L-Phénylalanyl-

40

daunorubicine (identifiée par β Ala-Ala-Leu-Phé-DNR partout ci-dessous) ou la β Alanyl-L-Alanyl-L-Leucyl-L-Phénylalanyl-doxorubicine (identifiée par β Ala-Ala-Leu-Phé-DOX partout ci-dessous).

5 La présente invention concerne également la composition pharmaceutique comprenant le composé selon l'invention et éventuellement un adjuvant ou véhicule pharmaceutique acceptable.

Ces compositions peuvent par exemple être
10 administrées par voie parentérale ou intraveineuse. Les compositions selon l'invention pour administration par voie parentérale peuvent être notamment des solutions stériles aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule pharmaceutique acceptable, on peut
15 employer le propylène-glycol, le polyéthylène-glycol, des esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle, ou les cyclodextrines. Ces compositions peuvent également comprendre des agents mouillants, émulsifiants et/ou dispersants.

20 La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple à l'aide d'un filtre bactériologique en incorporant à la composition des agents stérilisants, ou par irradiation. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles, qui peuvent être
25 dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

La présente invention peut également comprendre des adjuvants bien connus de l'Homme du Métier (vitamine C, agents antioxydants, ...) pouvant être utilisés en synergie
30 avec le composé selon l'invention pour améliorer et prolonger le traitement des tumeurs cancéreuses.

Les doses d'administration minimales des composés selon l'invention à un patient, sont les doses habituelles des agents thérapeutiques antitumoraux susmentionnés, telles
35 que notamment décrites par Bruce A. Chabner et Jerry M. Collins (Cancer Chemotherapy, Lippincott Ed., ISBN 0-397-

50900-6 (1990)) ou des doses d'administration plus élevées.

Les doses administrées varient donc en fonction de l'agent thérapeutique utilisé pour la préparation du composé selon l'invention.

5 La présente invention concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des tumeurs cancéreuses, ainsi qu'un procédé de traitement thérapeutique des tumeurs cancéreuses, consistant en l'administration, en
10 particulier par voie parentérale ou intraveineuse, à un patient de la composition pharmaceutique selon l'invention.

La présente invention concerne également l'utilisation de la composition pharmaceutique selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au
15 traitement des réactions inflammatoires, en particulier des rhumatismes, ainsi qu'un procédé de traitement thérapeutique des réactions inflammatoires, en particulier des rhumatismes, consistant en l'administration, en particulier par voie parentérale ou intraveineuse, à un patient de la composition
20 pharmaceutique selon l'invention, en particulier, une composition pharmaceutique comprenant un composé selon l'invention dans lequel l'agent thérapeutique (M) est le méthotrexate ou un dérivé de méthotrexate.

Un autre aspect de la présente invention concerne
25 un dispositif de diagnostic et/ou de dosage comprenant le composé selon l'invention, en particulier le composé comprenant comme marqueur la coumarine.

Brève description des figures.

La figure 1 représente le mécanisme d'action du composé
30 selon l'invention sur son site d'action (S.A.) dans une cellule cible (C.C.).

La figure 2 représente le mécanisme d'action du composé selon l'invention dans une cellule normale (C.N.).

35

- La figure 3 représente l'hydrolyse de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine dans du milieu conditionné de cellules de carcinome mammaire humain MCF7/6 (chromatogramme au temps initial (a) et après deux heures d'incubation (b)).
- La figure 4 représente l'hydrolyse de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine dans du milieu conditionné de cellules de carcinome mammaire humain MCF7/ADR (chromatogramme au temps initial (a) et après une heure d'incubation (b)).
- La figure 5 représente l'hydrolyse de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine dans du milieu conditionné de cellules de carcinome du colon HT29 (chromatogramme au temps initial (a) et après deux heures d'incubation (b)).
- La figure 6 représente l'accumulation de la daunorubicine (DNR) à la concentration de 10 μ g/ml par des cellules MCF7/6 confluentes.
- La figure 7 représente l'accumulation de la N-L-Leucyl-daunorubicine (Leu-DNR) à la concentration de 10 μ g eq. DNR/ml par des cellules MCF7/6 confluentes.
- La figure 8 représente l'accumulation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine à la concentration de 10 μ g eq. DNR/ml par des cellules MCF7/6 confluentes.
- La figure 9 représente l'accumulation de la daunorubicine (DNR) à la concentration de 10 μ g/ml par des cellules fibroblastiques MRC5 confluentes.
- La figure 10 représente l'accumulation de la N-L-Leucyl-daunorubicine (Leu-DNR) à la concentration de 10 μ g eq. DNR/ml par des cellules fibroblastiques MRC5 confluentes.

- La figure 11 représente l'accumulation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine à la concentration de 10 μ g eq. DNR/ml par des cellules fibroblastiques MRC5 confluentes.
- 5 La figure 12 représente la cytotoxicité de la daunorubicine (DNR), la L-Leu-daunorubicine et la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine vis-à-vis des cellules MCF7/6 maintenues en croissance pendant 72 heures en présence des anthracyclines.
- 10 La figure 13 représente la cytotoxicité de la daunorubicine (DNR), la L-Leu-daunorubicine et la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine vis-à-vis des cellules fibroblastiques MRC5 maintenues en croissance pendant 72 heures en présence des anthracyclines.
- 15 La figure 14 représente la mortalité des souris NMRI femelles après administration i.p. 5 jours consécutifs de la daunorubicine (DNR) aux doses totales comprises entre 2.0 et 3.5 mg/kg.
- 20 La figure 15 représente l'évolution du poids moyen des souris NMRI femelles ayant reçu par voie i.p. 5 jours consécutifs des doses totales de daunorubicine comprises entre 2.0 et 3.5 mg/kg. Les poids sont exprimés en pourcentage du poids initial moyen pour chaque groupe.
- 25 La figure 16 représente la mortalité des souris NMRI femelles après administration i.p. 5 jours consécutifs de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine à des doses totales comprises entre 10 et 60 mg/kg.
- 30 La figure 17 représente l'évolution du poids moyen des souris NMRI femelles ayant reçu par voie i.p. 5 jours consécutifs des doses totales de β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine comprises entre 10 et 60 mg/kg. Les poids sont exprimés en
- 35

pourcentage du poids initial moyen pour chaque groupe.

5 La figure 18 représente la mortalité des souris NMRI femelles après administration i.v. unique de la daunorubicine (DNR) à des doses comprises entre 10 et 35 mg/kg.

10 La figure 19 représente l'évolution du poids moyen des souris NMRI femelles ayant reçu par voie i.v. des doses de daunorubicine (DNR) comprises entre 10 et 35 mg/kg. Les poids sont exprimés en pourcentage du poids initial moyen pour chaque groupe.

15 La figure 20 représente l'évolution du poids moyen des souris NMRI femelles ayant reçu par voie i.v. des doses de β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine comprises de 30 et 60 mg/kg. Les poids sont exprimés en pourcentage du poids initial moyen pour chaque groupe.

20 La figure 21 représente l'évolution du poids moyen des souris NMRI femelles ayant reçu par voie i.v. soit une dose de 30 mg/kg de β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorubicine, soit deux doses de 30 mg/kg chacune deux jours consécutifs. Les poids sont exprimés en pourcentage du poids initial moyen pour chaque groupe.

25 La figure 22 représente la cinétique d'hydrolyse enzymatique de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicine en L-Ala-L-Leu-doxorubicine et L-Leu-doxorubicine dans un milieu conditionné par des cellules MCF7/6.

30 La figure 23 représente l'accumulation de la doxorubicine (DOX) à la concentration de 10 μ g/ml par des cellules MCF7/6 confluentes.

35 La figure 24 représente l'accumulation de la L-Leu-doxorubicine à la concentration de 10 μ g/ml par des cellules MCF7/6 confluentes.

- La figure 25 représente l'accumulation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicine à la concentration de 10 μ g/ml par des cellules MCF7/6 confluentes.
- 5 La figure 26 représente l'accumulation de la doxorubicine (DOX) à la concentration de 10 μ g/ml par des cellules fibroblastiques MRC5 confluentes.
- 10 La figure 27 représente l'accumulation de la L-Leu-doxorubicine à la concentration de 10 μ g/ml par des cellules fibroblastiques MRC5 confluentes.
- La figure 28 représente l'accumulation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicine à la concentration de 10 μ g/ml par des cellules fibroblastiques MRC5 confluentes.
- 15 La figure 29 représente la cytotoxicité de la doxorubicine (DOX), de la L-Leu-doxorubicine et de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicine vis-à-vis des cellules MCF7/6 maintenues en croissance pendant 72 heures en présence desdits dérivés d'anthracycline.
- 20 La figure 30 représente la cytotoxicité de la doxorubicine (DOX), de la L-Leu-doxorubicine et de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicine vis-à-vis des cellules fibroblastiques MRC5 maintenues en croissance pendant 72 heures en présence desdits dérivés d'anthracycline.
- 25 La figure 31 représente la variation de la masse tumorale moyenne d'une tumeur mammaire humaine MCF7/6 implantée chez des souris athymiques au jour T-21 en fonction de l'administration de doxorubicine (DOX) et de β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicine (super DOX).
- 30 La figure 32 représente la variation du poids moyen de souris (grammes) traitées par l'administration de doxorubicine (DOX) et de β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicine (super DOX).
- 35

La figure 33 représente l'expression du marqueur coumarine libre (nombre de moles de coumarine libérées par milligramme de protéines cellulaires) dans des tubes à essai comprenant le composé selon l'invention avec des homogénats de cellules tumorales, des homogénats de cellules transformées et des homogénats de cellules normales.

Description d'une forme d'exécution préférée de l'invention.

La présente invention repose sur la découverte inattendue qu'il est possible de rendre un marqueur ou un agent thérapeutique (M), en particulier un agent thérapeutique antitumoral et/ou anti-inflammatoire, inactif par la liaison avec un ligand (W-Z) qui inhibe l'expression du marqueur ou empêche la pénétration intracellulaire de l'agent thérapeutique (M) dans des cellules normales (C.N.) et des cellules cibles (C.C.).

Selon l'invention, lesdites cellules cibles sont des cellules tumorales ou des cellules intervenant dans des réactions anti-inflammatoires, en particulier liées au rhumatisme, telles que les macrophages, les monocytes, ...

De manière inattendue, les cellules cibles (C.C.) libèrent dans le milieu extracellulaire des enzymes telles que des protéases ou des peptidases qui sont susceptibles d'hydrolyser sélectivement une liaison covalente entre le bras (Z) du ligand (W-Z) et le marqueur (M) ou l'agent thérapeutique (M), de manière à permettre l'expression du marqueur (M) ou la pénétration de l'agent thérapeutique (M) dans lesdites cellules cibles (C.C.). Dans la cellule cible, l'agent thérapeutique (M) agit soit directement sur son site d'action intracellulaire spécifique (S.A.) ou après une modification sous l'action de protéases intracellulaires, se modifie en un autre agent thérapeutique (M*) et tue la cellule cible (C.C) ou bloque sa prolifération (figure 1).

Comme les cellules normales ne libèrent pas ou peu lesdites enzymes in vivo, le composé selon l'invention est

maintenu inactif et ne pénètre pas dans les cellules normales (figure 2).

En particulier, l'expression du marqueur (via un intermédiaire émettant par exemple de la lumière) permet de caractériser les cellules cancéreuses, améliorant ainsi le diagnostic du cancer, l'étude de l'évolution de la tumeur, le dosage des facteurs sécrétés par les cellules tumorales, ...

Le composé décrit dans la présente demande de brevet répond à ce mécanisme d'action, car il remplit les critères nécessaires pour être administré de manière efficace :

1. L'agent thérapeutique (M) :

- possède un site d'action intracellulaire,
- une haute activité spécifique,
- un groupement chimique permettant une liaison covalente avec un ligand (W-Z);
- si le groupement chimique requis n'est pas essentiel à l'activité de l'agent thérapeutique (M), celui-ci ne doit pas être restitué intact après hydrolyse enzymatique de ladite liaison covalente.

2. La liaison avec le ligand (W-Z) empêche la pénétration intracellulaire de l'agent thérapeutique (M) tant dans les cellules normales que dans les cellules cibles.

3. Le composé selon l'invention reste stable dans le sérum et dans le sang, et est insensible à l'action des protéinases et peptidases circulantes et associées aux globules rouges.

4. La liaison covalente existant entre l'agent thérapeutique (M) et le ligand (W-Z) est dégradée partiellement ou totalement par les enzymes sécrétées par les cellules cibles.

5. La nature du ligand (W-Z) et sa liaison au marqueur ou à l'agent thérapeutique (M) sont déterminées en fonction des enzymes sécrétées par les cellules cibles.

6. Le composé est moins toxique in vivo que l'agent thérapeutique de départ. Cette diminution de toxicité concerne notamment les effets aigus tels que la toxicité médullaire et mucosale, ainsi que la toxicité cardiaque ou neurologique éventuelle.

Dérivés d'anthracyclines.

L'agent thérapeutique (M) selon l'invention peut être un dérivé d'anthracycline, en particulier la doxorubicine, la daunorubicine, le 4-épi-doxorubicine, le 4-déméthoxy-doxorubicine (Idarubicine), le 4'-tetrahydropyranyl-doxorubicine (Pirarubicine), la carminomycine, l'ésorubicine et la 4'-iodo-doxorubicine.

Le ligand (W-Z) est ensuite lié par sa fonction carboxylique à l'extrémité α -amino de l'agent thérapeutique.

Dérivés d'acide folique.

L'agent thérapeutique antitumoral peut également être un dérivé d'acide folique, en particulier le méthotrexate (MTX) ou ses dérivés, tels que la lysine (ϵ - γ)-MTX ou la lysine (ϵ - α)-MTX telles que décrites par Fitzpatrick et al. (Anti-cancer Drug Design 10, pp. 1-9 et pp. 11-24 (1995)) ou l'aminoptérine, en particulier la lysine (ϵ - γ)-AMPT et la lysine (ϵ - α)-AMPT.

Le ligand (W-Z) est ensuite lié par sa fonction carboxylique à l'extrémité α -amino de l'agent thérapeutique.

Dérivés d'alcaloïde vinca.

Les dérivés d'alcaloïdes vinca selon la présente invention sont notamment des dérivés de vinblastine, de vincristine, de vindesine et de navelbine.

A. Liaison en position 3.

1. L'acide déacétylvincristine, qui est formé par l'addition de lysine au groupe amino- ϵ pour obtenir une lysine (ϵ)-dAcVCR. Ensuite, le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe α -amino de la lysine (ϵ)-dAcVCR.

2. L'acide déacétylvincristine peut être également obtenu en ajoutant une diamine aliphatique à la vincristine ($\text{NH}_2\text{-alkyl-NH}_2$) de manière à obtenir un $\text{NH}_2\text{-alkyl-dAcVCR}$, le ligand (W-Z) étant ensuite lié par son extrémité carboxylique au groupe α -amino de la lysine (ϵ)-dAcVCR.

Les dérivés de vinblastine (VBL) et de navelbine (5'-noranhydrovinblastine) peuvent être liés au ligand (W-Z) de la même manière que décrit précédemment pour la vincristine.

10 B. Liaison en position 4.

1. La V_4 -hemiaspartate-vincristine est formée à partir de vincristine par liaison de l'acide aspartique au travers de son groupe γ -carboxylique au groupe hydroxyl en position 4 de la vincristine (V_4). Ensuite, le ligand (ZW-Z est lié par son extrémité carboxylique au groupe α -amino de la V_4 -hemiaspartate-vincristine.
2. La V_4 -lysyl-vincristine est formée à partir de vincristine en liant la lysine par son groupe α -carboxylique au groupe hydroxyl en position 4 de la vincristine (V_4). Ensuite, le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe α -amino de la V_4 -lysyl-vincristine.
3. La V_4 -lysyl-vincristine est formée à partir de vincristine en liant la lysine par son groupe α -carboxylique au groupe hydroxyl en position 4 de la vincristine (V_4). Ensuite, le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe ϵ -amino de la lysine de la V_4 -lysyl-vincristine. Selon une alternative, le ligand (W-Z) peut être lié à la fois aux groupes α - et ϵ -amino de la V_4 -lysyl-vincristine.
4. La V_4 - β -Alanyl-vincristine est formée à partir de vincristine en liant la β -Alanyl par son groupe carboxylique au groupe hydroxyl en position 4 de la vincristine (V_4). Ensuite, le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe amino de la β -Alanyl de la V_4 - β -Alanyl-vincristine.

Des dérivés de vinblastine, de vindesine et de navelbine peuvent être liés au ligand (W-Z) de la même manière que décrit ci-dessus pour la vincristine.

Dérivés de calichéamycine.

5 La N-Acetyl-diméthylhydrazide dérivée de calichéamycine est obtenue par réaction d'un hydrazide de thiol sur la calichéamycine.

Le ligand (W-Z) est ensuite lié par son extrémité carboxylique à la N-Acetyl-diméthylhydrazide dérivée de
10 calichéamycine.

Dérivés de mitoxanthrone.

Un β -Alanyl dérivé de mitoxanthrone est préparé par liaison de la fonction carboxylique de la β -Alanyl aux chaînes latérales hydroxyl du mitoxanthrone.

15 Une mono- ou une bisubstitution est ensuite possible. Le ligand (W-Z) est ensuite lié par son extrémité carboxylique au groupe amino de la β -Alanyl-mitoxanthrone.

Dérivés de cytosine arabinoside (ARA-C).

Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité
20 carboxylique au groupe amino de la cytosine arabinoside.

Dérivés d'adénosine arabinoside (Ara-A).

Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe amino de l'adénosine arabinoside.

25 Dérivés de fludarabine phosphate.

Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe amino du fludarabine phosphate.

Dérivés de melphalan.

Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité
30 carboxylique au groupe amino du melphalan.

Dérivés de bléomycine.

Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe amino de la bléomycine, de la péplomycine ou de la liblomycine.

35

Dérivés de mitomycine.

Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe amino en position 7 de la mitomycine.

Dérivés de L-canavanine.

5 Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe α -amino de la L-canavanine.

Dérivés de taxoïdes.

Un dérivé β -Alanyl de taxol est préparé par liaison de la fonction carboxylique du β -Alanyl aux chaînes latérales
10 hydroxyl en position 7 du taxol.

Le groupe hydroxyl du taxol est réactif mais pas essentiel à l'activité antitumorale du taxol (Nicalaou K.C. et al., Chemistry and Biology of Taxol, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1994), 33, pp. 15-44).

15 Ensuite, le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe amino du β -Alanyl-taxol.

Le ligand (W-Z) peut être lié de manière comparable au dérivé β -Alanyl-taxotère.

Dérivés de camptothécine.

20 Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupe α -amino de la 9-amino-camptothécine ou de la 7-amino-méthyl-camptothécine.

La présente invention sera décrite de manière plus
25 détaillée dans les exemples suivants donnés à titre d'illustration non limitative de la présente invention.

Exemple 1.Synthèse de la N-L-Leucyl-daunorubicine (Leu-DNR)

30 La L-Leucyl-daunorubicine est synthétisée par réaction de la daunorubicine sous forme de base (DNR) avec la L-Leucine protégée sur sa fonction amine par un groupe Fmoc (fluorenyl-méthoxy-carbonyl) et dont la fonction carboxylique est activée par de l'IBCF
35 (isobutylchloroformiate), puis déprotection de la fonction amine.

La DNR sous forme de base est préparée à partir de 200 mg de chlorhydrate de daunorubicine (R. Bellon) dissous dans 500 µl de DMF (diméthylformamide) auxquels on ajoute 1,2 équivalents de N-Méthyle-Morpholine.

5 1,2 équivalents de Fmoc-N-Leucine (NOVA BIOCHEM) sont dissous dans 500 µl de DMF (diméthylformamide), et 1,2 équivalents de N-Méthyle-Morpholine et 1,2 équivalents d'IBCF sont ajoutés à -20°C. Après 15 minutes cette solution est ajoutée à celle de la DNR base et le mélange est laissé
10 pendant 16 heures, sous agitation, à l'abri de la lumière.

La Fmoc-N-L-Leucyl-daunorubicine est précipitée dans 150 ml d'un mélange 1:1 d'éther et d'éther de pétrole (40-60°C) puis filtrée sur verre fritté n°4. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (silice Si-
15 60 70-230 mesh de E. MERCK) éluée par du chloroforme. La DNR résiduelle est éluée par 10% de Méthanol. Les fractions contenant la Fmoc-N-L-Leucyl-DNR sont rotavapées, le produit repris dans 500 µl de DMF. La déprotection est réalisée en ajoutant 5 équivalents de diéthylamine (LAB SCAN) à -20°C.

20 Après 1 heure la N-L-Leucyl-DNR est précipitée par un mélange 1:1 d'éther et d'éther de pétrole (40-60°C), puis filtrée sur verre fritté no4. Le produit est repris dans un mélange chloroforme/méthanol (4:1 en volume) et la diéthylamine est neutralisée par un équivalent d' HCl.

25 Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (silice Si-60 70-230 mesh de E. MERCK) éluée par du chloroforme, puis du chloroforme contenant 15% de Méthanol. Les fractions contenant la N-L-Leucyl-DNR sont rotavapées, le produit repris dans de l' eau distillée et le
30 chlorhydrate formé par ajustement du pH à 7 par de l' HCl 1N. Le produit est ensuite filtré sur gel de silice modifié (sep-pak C18 de WATERS), le chlorhydrate de N-L-Leucyl-daunorubicine est élué par du méthanol puis rotavapé. Le rendement habituel est de 70 à 80%.

35

Caractéristiques des produits.

| Composé | Formule | Point fusion (°C) | Rf TLC | Tr HPLC |
|-------------|------------------------------|-------------------------|--------|------------|
| DNR | $C_{27}H_{29}NO_{10}, HCL$ | 189 | 0,05 | 0,67 |
| 5 L-Leu-DNR | $C_{33}H_{40}N_2O_{11}, HCL$ | 201 | 0,31 | 0,48 |

Rf TLC : système chloroforme : méthanol : eau (120:20:1, en volume)

10 Tr HPLC : temps de rétention par rapport à la doxorubicine, système HPLC : colonne Si-60, éluée par un mélange chloroforme : méthanol : acide acétique : sol. aqueuse de $MgCl_2$ 0,3 mM (1440:420:80:60, en volume).

15

Synthèse de la β -L-Alanyl-L-Leucyl-L-Alanine.

La β -L-Alanyl-L-Leucyl-L-Alanine est préparée par synthèse en phase solide selon la technique de Merrifield (The Chemistry of Polypeptides, (P.G. Katsoyannis Ed.), 20 Plenum Press, New-York, pp. 336-361 (1973)).

Dérivés de fluorochromes.

Le ligand (W-Z) est lié par son extrémité carboxylique au groupement amino de la rhodamine 123.

25

Synthèse de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR.

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est synthétisée par greffage de la Fmoc- β -L-Alanyl-L-Leucyl-L-Alanine, préparée par synthèse en phase solide, sur la N-L-Leucyl- 30 daunorubicine.

A la Fmoc- β -L-Alanyl-L-Leucyl-L-Alanine (1,5 équivalents) dissoute dans la DMF sont ajoutés 1,5 équivalents (eq.) de N-méthyle-morpholine et 1,5 eq. d'isobutyl chloroformiate. Après 10 minutes à $-20^\circ C$, 1,5 eq.

d'HOBT sont ajoutés. Puis après 5 minutes, 1 eq. de N-L-Leucyl-daunorubicine base dissous dans la DMF est ajouté. Après réaction, la Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est précipitée à l'éther, puis déprotégée par la diéthyleamine. La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est purifiée par chromatographie sur colonne de silice et le chlorhydrate formé par addition d'HCl 1N.

Synthèse de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX.

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX est synthétisée par greffage de la β -L-Alanyl-L-Leucyl-L-Alanine, préparée par synthèse en phase solide, sur la N-L-Leucyl-doxorubicine, tel que décrit pour la synthèse de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR.

Dans cette synthèse, l'agent de couplage (isobutyl chloroformiate) peut être omis de manière à augmenter encore le rendement de production du composé selon l'invention dans le cas de formation de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX.

Exemple 2.

Dégradation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR dans un milieu conditionné de cellules de carcinome mammaire MCF7/6.

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR a été incubée à 37°C pendant 2 heures dans du milieu conditionné de cellules MCF7/6, concentré 20 ou 4 fois, et le composé ainsi que les produits de digestion ont été extraits à pH 9 et analysés par HPLC (figure 3).

| Produit de départ ou Métabolite | Temps 0 | Après 1 heure | Après 2 heures |
|------------------------------------|---------|------------------|-------------------|
| β -Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | 100 % | 10 % | 2,6 % |
| L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR ou DNR | 0 % | 3,0 % | 7,3 % |
| L-Ala-L-Leu-DNR | 0 % | < 1 % | < 1 % |
| L-Leu-DNR | 0 % | 83 % | 90 % |

Il en ressort que la L-Leu-DNR est le métabolite majeur de l'endopeptidase et que sa formation) partir de la prodroque est quasi complète après 1 heure d'incubation à 37°C. Dans les conditions expérimentales utilisées, la L-Leu-
 5 L-Ala-L-Leu-DNR et la DNR ne sont pas suffisamment séparées pour que l'on puisse affirmer avec certitude que la L-Leu-DNR formée s'hydrolyse ensuite plus lentement en DNR.

Exemple 3.

10 Dégradation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX dans le milieu conditionné de cellules de carcinome mammaire MCF7/6.

Quand la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX est incubée à 37°C pendant 2 heures dans du milieu conditionné de cellules MCF7/6 concentré 20 fois, on ne retrouve plus comme
 15 métabolite que de la L-Leu-DOX et de la DOX.

| | Produit de départ ou Métabolite | Temps 0 | Après 2 heures |
|----|------------------------------------|---------|-------------------|
| | β -Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX | 100 % | 23 % |
| 20 | L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX | 0 % | < 1 % |
| | L-Ala-L-Leu-DOX | 0 % | < 1 % |
| | L-Leu-DOX | 0 % | 68 % |
| | DOX | 0 % | 9 % |

25 La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX est hydrolysée moins rapidement que la prodroque de la DNR par la ou les peptidases sécrétées par les cellules MCF7/6. Par contre, la transformation de la L-Leu-DOX en DOX semble un peu plus importante que la transformation de la L-Leu-DNR en DNR.

30

Exemple 4.

Dégradation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR et de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX dans le sang humain.

Tout comme la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, la β -Ala-Leu-
 35 Ala-Leu-DOX est stable quand elle est incubée à 37°C dans du

sang humain. En effet, moins de 2 % de la prodrogue est hydrolysée en L-Leu-DOX après 2 heures, tandis que les autres dérivés synthétisés s'hydrolysent rapidement en présence de sang humain (voir tableau 1 ci-dessous).

Tableau 1 : HYDROLYSE DE DERIVES DE LA DAUNORUBICINE (DNR)
ET DE LA DOXORUBICINE (DOX)

| | COMPOSE | Sang Humain | Milieu Conditionné MCF-7/6 | |
|----|-------------------------------------|-------------|----------------------------|------------------------|
| 5 | L-Leu-DNR | + | - | Hydrolyse en DNR |
| | D-Leu-DNR | - | - | " |
| | diEthyle- β -Ala-DNR | - | - | " |
| | L-NorLeu-DNR | - | - | " |
| | L-Ala-L-Leu-DNR | + | + | Hydrolyse en L-Leu-DNR |
| 10 | L-Ala-L-Ala-DNR | + | - | Hydrolyse en DNR |
| | L-Ala-L-Ileu-DNR | + | + | " |
| | L-Ala-L-NorLeu-DNR | - | - | " |
| | β -Ala-L-Leu-DNR | - | - | " |
| | L-Phé-L-Leu-DNR | + | (\pm) | " |
| 15 | L-Ala-L-Ala-L-Leu-DNR | + | - | Hydrolyse en L-Leu-DNR |
| | L-NLeu-L-Ala-L-Leu-DNR | + | + | " |
| | L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | + | + | " |
| | L-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | + | + | " |
| | L-Ala-L-Leu-Gly-L-Leu-DNR | + | (\pm) | Hydrolyse en DNR |
| 20 | Gly-L-Leu-Gly-L-Leu-DNR | + | + | " |
| | Succ-L-Ala-L-Leu-DNR | - | - | Hydrolyse en L-Leu-DNR |
| | Succ-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | - | - | " |
| | Succ-L-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | (+) | - | " |
| | pGlu-L-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX | + | - | Hydrolyse en L-Leu-DOX |
| 25 | D-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | - | - | Hydrolyse en L-Leu-DNR |
| | D-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | + | (+) | " |
| | D-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | + | + | " |
| | D-Leu-D-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | (+) | (+) | " |
| | β -L-Ala-L-Leu-DNR | - | - | " |
| 30 | L-NLeu- β -L-Ala-L-Leu-DNR | + | + | " |
| | β -Ala-L-Ala-L-Leu-DNR | - | - | " |
| | β -Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR | - | + | Hydrolyse en L-Leu-DNR |
| | β -Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX | - | + | Hydrolyse en L-Leu-DOX |
| | β -Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-COU* | - | + | Hydrolyse en L-Leu-COU |

Exemple 5.Dégradation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR dans le milieu conditionné de cellules de carcinome mammaire MCF7/ADR.

Quand la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est incubée à 37°C pendant 1 heure dans du milieu conditionné de cellules MCF7 résistantes aux anthracyclines (lignée MCF7/ADR), on ne retrouve comme métabolite que de la L-Leu-DNR (figure 4).

Les cellules MCF7/6, sensibles et résistantes aux anthracyclines, secrètent toutes deux la ou les protéases capables d'hydrolyser le composé selon l'invention.

Exemple 6.Dégradation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR dans le milieu conditionné de cellules d'hépatocarcinome HepG2.

Quand la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est incubée à 37°C pendant 2 heures dans du milieu conditionné de cellules d'hépatocarcinome HepG2, les métabolites principaux que l'on retrouve sont la L-Leu-DNR (27% de la fluorescence totale) et la L-Ala-L-Leu-DNR (8%). Le pourcentage d'hydrolyse ne peut être comparé entre les cellules de carcinome mammaire MCF7 et d'hépatocarcinome HepG2, car le nombre de cellules à partir desquelles les milieux conditionnés ont été récupérés, ainsi que les concentrations des milieux conditionnés, sont différents. L'analyse qualitative indique néanmoins que la ou les peptidase(s) n'est (ne sont) pas spécifique(s) des cellules MCF7.

Exemple 7.Dégradation de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR dans le milieu conditionné de cellules de carcinome du colon HT29.

Quand la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est incubée à 37°C pendant 2 heures dans du milieu conditionné, concentré 40 fois, de cellules de carcinome du colon HT29, les métabolites principaux que l'on retrouve sont la L-Leu-DNR (82% de la fluorescence totale) et la L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR et/ou la DNR

(3%), tel qu'illustré à la figure 5.

Exemple 8.

Accumulation sur cellules tumorales MCF7/6 de la DNR, de la
5 L-Leu-DNR et de la β -Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR.

Les cellules du carcinome mammaire humain MCF7/6
ont été incubées en présence de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR à une
concentration de 10 μ g eq. DNR/ml. Après divers temps,
l'accumulation des prodrogues et de leurs métabolites
10 fluorescents ont été déterminés par HPLC après extraction
dans produits à pH basique, selon une méthode mise au point
au laboratoire. Les accumulations, exprimés en μ g/mg de
protéines cellulaires, ont été comparées à celles de la DNR
et de la DOX ainsi qu'à celles des L-Leu-DNR et L-Leu-DOX.
15 Les métabolites ont été identifiés par détermination des
temps de rétention de produits de référence synthétisés au
laboratoire.

La DNR s'accumule rapidement dans les cellules
MCF7/6 essentiellement sous forme inchangée, le maximum
20 d'accumulation (\pm 15 μ g/mg de protéines cellulaires) étant
atteint après 6 heures d'incubation. L'accumulation de la DNR
diminue ensuite jusqu'à 24 heures. Le métabolite principal
intracellulaire est le daunorubicinol, résultant de la
réduction de la fonction cétone de la DNR, en position C13,
25 par des réductases intracellulaires (figure 6).

La L-Leu-DNR s'accumule également très rapidement
par les cellules MCF7/6, mais à des taux moindres et
l'accumulation atteint un plateau après 24 heures
d'incubation, se situant à \pm 14 μ g/mg de protéines
30 cellulaires. La DNR se forme intracellulairement de façon
progressive au cours du temps pour atteindre 14% de la
fluorescence totale intracellulaire après 24 heures
d'incubation (figure 7).

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, incubée pendant 24 heures
35 en présence de cellules MCF7/6, s'accumule sous forme
inchangée, beaucoup moins que la DNR et que la L-Leu-DNR, le

taux d'accumulation n'étant que de ± 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires (figure 8). Ce sont essentiellement la L-Leu-DNR, formée extracellulairement, et la DNR que l'on retrouve dans les cellules après 24 heures d'incubation. La DNR retrouvée intracellulairement représente, après 24 heures d'incubation, environ 40% de la fluorescence totale.

Tableau 2 : Concentrations intracellulaires en produit de départ L-Leu-DNR et DNR après 6 heures d'incubation des cellules MCF7/6 soit avec la DNR, la L-Leu-DNR ou la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR.

| Incubation avec | Produit de départ | Leu-DNR formée | DNR formée |
|------------------------------|-------------------------------|----------------|------------|
| | (μg/mg protéines cellulaires) | | |
| DNR | 14,9 | - | - |
| Leu-DNR | 13,4 | - | 1,5 |
| β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR | 0,3 | 4,5 | 0,9 |

Les résultats du tableau 1 indiquent que le passage des dérivés peptidiques de la DNR à travers les membranes cellulaires diminue quand la longueur de la chaîne peptidique augmente, et que la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est un précurseur de la Leu-DNR, activé extracellulairement. La Leu-DNR libérée s'accumule intracellulairement et devient elle-même un précurseur intracellulaire de la DNR.

Exemple 9.

Accumulation sur cellules normales MRC5 de la DNR, de la L-Leu-DNR et de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR.

Les cellules de fibroblastes MRC5 ont été incubées en présence de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR à une concentration de 10 μg eq. DNR/ml. A divers temps, l'accumulation des prodrogues et de leurs métabolites fluorescents a été déterminée par HPLC après extraction des produits à pH

basique, selon une méthode mise au point au laboratoire. Les accumulations, exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires, ont été comparées à celles de la DNR et de L-Leu-DNR. Les métabolites ont été identifiés par détermination des temps de rétention de produits de référence synthétisés au
5 laboratoire.

La DNR s'accumule principalement dans les cellules MRC5 sous forme inchangée, et l'accumulation atteint un plateau de $\pm 76 \mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires après 6
10 heures, le métabolite majeur étant le daunorubicinol (figure 9).

La L-Leu-DNR s'accumule également très rapidement par les cellules MRC5, mais à des taux moindres, et l'accumulation atteint un plateau après 24 heures
15 d'incubation, se situant à $\pm 40 \mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires. Les métabolites principaux sont la DNR ainsi que le L-Leu-DNR-OL (figure 10).

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, incubée pendant 24 heures en présence de cellules MRC5, s'accumule beaucoup moins que
20 la DNR et que la L-Leu-DNR, le taux d'accumulation n'étant que de $\pm 3,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires (figure 11). C'est essentiellement la L-Leu-DNR, formée extracellulairement, que l'on retrouve dans les cellules. Son accumulation augmente linéairement jusqu'à 24 heures
25 d'incubation.

Ces résultats corroborent ceux obtenus sur les cellules MCF7/6, à savoir que le composé β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR ne rentre pratiquement pas dans les cellules (≈ 300 fois moins que la DNR après 6 heures) et que c'est la L-Leu-DNR
30 formée extracellulairement qui s'accumule essentiellement dans les cellules MRC5 (tableau 3).

Tableau 3 : Concentrations intracellulaires en produit de départ L-Leu-DNR et DNR après 6 heures d'incubation des cellules MRC5 soit avec la DNR, la L-Leu-DNR ou la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR.

5

| Incubation avec | Produit de départ | Leu-DNR formée | DNR formée |
|------------------------------|-------------------------------|----------------|------------|
| | (µg/mg protéines cellulaires) | | |
| DNR | 77,4 | - | - |
| Leu-DNR | 36,0 | - | 1,3 |
| β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR | 0,03 | 3,1 | 0,08 |

10

Dans la lignée tumorale MCF7/6, les taux intracellulaires obtenus de DNR après 24 heures d'incubation en présence du composé β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR sont 12 fois plus élevés que dans les fibroblastes MRC5.

15

Quand les cellules sont incubées en présence de Leu-DNR et de DNR, le rapport des taux intracellulaires de DNR n'est respectivement que de 0,37 et 0,19.

Exemple 10.

20 Cytotoxicité de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR vis-à-vis des cellules tumorales MCF7/6 et normales MRC5.

La cytotoxicité de la prodroque DNR, de la Leu-DNR et de la DNR a été comparée sur cellules MCF7/6 et MRC5 maintenues en croissance pendant 72 heures en présence des
25 divers composés.

Les cytotoxicités de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, de la L-Leu-DNR et de la DNR ont été déterminées sur cellules MCF7/6 en croissance dans des boîtes à 96 puits, incubées en présence de concentrations croissantes des divers composés.
30 Après 72 heures, les cellules sont incubées pendant 48 heures en absence d'anthracycline et la cytotoxicité est déterminée par mesure des protéines cellulaires par la technique de Bradford. Une gamme de 9 concentrations sont utilisées,

allant de 700 µg/ml jusqu'à 0,0035 µg/ml, et chaque mesure représente une moyenne et une déviation standard de 6 valeurs. Les points expérimentaux sont ajustés à une courbe sigmoïde qui permet de calculer le point d'inflexion correspondant à la dose à laquelle la moitié des cellules survivent (IC₅₀).

La figure 12 illustre que l'IC₅₀ de la DNR est de 0,090 ± 0,004 µg/ml. Pour les cellules incubées pendant 72 heures en présence de la L-Leu-DNR, l'IC₅₀ est de 1,30 ± 0,56 µg/ml. Dans le cas de la β-Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, l'IC₅₀ est de 22,00 ± 7,31 µg/ml

La Leu-DNR et la β-Ala-Leu-Ala-Leu-DNR sont donc respectivement 14 fois et 244 fois moins cytotoxiques que la DNR pour les cellules du carcinome mammaire humain MCF7/6 maintenues en croissance pendant 72 heures en présence des anthracyclines.

Les cytotoxicités de la β-Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, de la L-Leu-DNR et de la DNR ont été déterminées sur cellules MRC5 en croissance dans des boîtes à 96 puits, incubées en présence de concentrations croissantes des divers composés. Après 72 heures, les cellules sont incubées pendant 48 heures en absence d'anthracycline et la cytotoxicité est déterminée par mesure des protéines cellulaires par la technique de Bradford. Une gamme de 9 concentrations sont utilisées, allant de 700 µg/ml jusqu'à 0,0035 µg/ml, et chaque mesure représente une moyenne et une déviation standard de 6 valeurs. Les points expérimentaux sont ajustés à une courbe sigmoïde qui permet de calculer le point d'inflexion correspondant à la dose à laquelle la moitié des cellules survivent (IC₅₀).

La figure 13 illustre que l'IC₅₀ de la DNR est de 0,010 ± 0,006 µg/ml. Pour les cellules incubées pendant 72 heures en présence de la L-Leu-DNR, l'IC₅₀ est de 1,78 ± 0,23 µg/ml. Dans le cas de la β-Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, l'IC₅₀ est de 23,14 ± 4,81 µg/ml.

La Leu-DNR et la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR sont donc respectivement 172 fois et 2230 fois moins cytotoxiques que la DNR pour les cellules fibroblastiques MRC5 maintenues en croissance pendant 72 heures en présence des anthracyclines.

- 5 Aussi bien pour les cellules tumorales que pour les cellules fibroblastiques, le précurseur de la DNR est beaucoup moins toxique que le composé parent. Il reste à déterminer si cette diminution de toxicité observée in vitro s'observe également in vivo.

10

Exemple 11.

Toxicité aiguë in vivo.

- La toxicité aiguë de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR a été comparée à celle de la daunorubicine sur souris. Dans l'étude in vivo de la toxicité aiguë d'un médicament, la détermination de la dose létale 50 (dose létale pour 50% des animaux ou LD₅₀) occupe une place importante. Malgré le fait qu'elle ne représente pas une constante biologique, elle donne des indications sur la toxicité aiguë du produit injecté. La LD₅₀ est un test simple où des quantités croissantes du produit à tester sont administrées par voie intraveineuse (i.v.) en une injection unique et par voie intrapéritonéale (i.p.) en 5 injections, une injection par jour pendant 5 jours consécutifs. La mortalité des animaux est suivie en fonction du temps. A la fin de la période d'observation, habituellement 30 jour, la valeur de la LD₅₀ est obtenue par régression linéaire du pourcentage de mortalité (sur échelle probit) en fonction du logarithme de la dose administrée (O. K. Chan and A. W. Hayes, *Principles and methods for acute toxicity and eye irritancy*, dans *Principles and methods of toxicology*, second edition. Ed. by A W. Hayes. Raven Press. New-York, USA (1989), pp. 169-220; D. Deprez-De Campeneere and A. Trouet. *DNA-Anthracycline Complexes. I. Toxicity in mice and chemotherapeutic activity against L1210 Leukaemia of Daunorubicin-DNA and Adriamycin-*
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

DNA, Eur. J. Cancer, 16 (1980), pp. 981-986; H. E. Skipper, L. H. Schmidt, A. Goldin and J. M. Venditti. A manual on quantitative drug evaluation in experimental tumor systems, Cancer Chemother. Rep. 17 (1962), pp. 1-178).

- 5 Dans le cas où la LD₅₀ n'est pas atteinte, l'évolution des poids journaliers des souris donne également une indication sur la toxicité aiguë des produits administrés.

10 1. Matériel et méthodes.

- La toxicité aiguë de ces deux drogues a été étudiée par les voies i.v. et i.p. sur une seule souche de souris. Les souris NMRI femelles (non consanguines IOPS-Han, d'environ 5 semaines et d'un poids moyen de 14,6 grammes, 15 provenant d'IFFA-CREDO Belgique) sont restées en quarantaine pendant une semaine. A la veille du jour des injections, elles ont été distribuées en groupes de 5 (β -la-Leu-Ala-Leu-DNR) et de 7 (DNR) par dose à injecter; leur poids a été repris (environ 22 grammes en moyenne).

- 20 Les injections ont été effectuées systématiquement le matin (injection unique dans la veine caudale pour les i.v. et injections 5 jours consécutifs dans le péritoine pour les i.p.), en utilisant des seringues de 1.0 ml et des aiguilles 30G (i.v.) et 27G (i.p.) stériles. Toutes les 25 manipulations d'animaux ont été effectuées avec des gants et l'entretien des animaux a été effectué systématiquement chaque semaine.

- La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR a été injectée par voie i.v. aux doses de 30, 60 et 120 mg/kg et par voie i.p. aux 30 doses totales de 10, 15, 20, 25, 30, 45 et 60 mg/kg. Sur deux groupes supplémentaires, la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR a été réinjectée par voie i.v. aux doses totales de 30 et 60 mg/kg en respectivement une et deux injections consécutives à 30 mg/kg.

- 35 La DNR a été injectée par voie i.v. aux doses de 10, 15, 20, 25, 30 et 35 mg/kg et par voie i.p. aux doses de

2,0; 2,5; 3,0 et 3,5 mg/kg.

Les solutions de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR et de la DNR ont été réalisées dans du NaCl physiologique de telle sorte que le volume injecté corresponde à 0,1 ml pour 10 grammes de souris. Les concentrations des solutions ont été vérifiées par spectrophotométrie.

A partir du jour des injections (J0), les souris ont été suivies cliniquement, avec un relevé journalier des souris mortes. Le poids des souris a été mesuré presque tous les jours. La période d'observation a été prolongée au-delà du mois, afin de mieux repérer les signes de toxicité tardive. A la fin de l'étude, les souris survivantes ont été sacrifiées, selon les normes de l'expérimentation animale (D. B. McGregor. *Ethics in experiments on animals*, dans Experiments in toxicology, first edition. Ed. by D. Anderson and D. M. Conning. The Royal Society of Chemistry and The Universities Press. Belfast, Ireland (1988), pp. 512-522).

2. Résultats.

20 Toxicité par voie intrapéritonéale.

Tel qu'illustré à la figure 14, en ce qui concerne la DNR, une toxicité importante est observée en fonction de la concentration, toxicité qui se manifeste par la mortalité des souris, à partir du jour 7 à la dose de 3,5 mg/kg (1 souris morte sur 7), à partir du jour 9 à la dose de 3,0 mg/kg (2 souris mortes sur 7) et à partir du jour 11 aux doses de 2,5 et 2,0 mg/kg (respectivement 2 et 1 souris mortes sur 7).

Aucune souris ne survit au jour 12 (dose de 3,5 mg/kg), au jour 19 (dose de 3,0 mg/kg) et au jour 29 (dose de 2,0 mg/kg). La seule souris survivante au jour 43 est une de celles injectées à la dose de 2,5 mg/kg. Ces résultats confirment ceux décrits précédemment (D. Deprez-De Campeneere and A. Trouet. *DNA-Anthracycline Complexes. I. Toxicity in mice and chemotherapeutic activity against L1210 Leukaemia*

of Daunorubicin-DNA and Adriamycin-DNA, Eur. J. Cancer, 16 (1980), pp. 981-986).

La figure 15 indique que quelle que soit la dose administrée, les souris accusent une perte de poids qui
5 atteint 30% du poids initial. Cette perte de poids est généralement irréversible, sauf pour une souris traitée à 2,5 mg/kg, qui a récupéré son poids initial au jour 30.

Quand la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est administrée par voie i.p. pendant 5 jours consécutifs à des doses totales
10 comprises entre 10 et 45 mg/kg, aucune mortalité n'est observée. A la dose de 60 mg/kg, 2 souris meurent au jour 22 et une troisième au jour 35 (figure 16).

Aux doses totales comprises entre 10 et 45 mg/kg, aucune perte de poids n'est observée, mais plutôt un gain
15 pondéral de $\pm 40\%$ en 40 jours (figure 17). L'analyse des courbes de poids ne démontre pas de différence significative. Par contre, à la dose de 45 mg/kg, le poids moyen des souris est stable pendant les 7 premiers jours, puis l'augmentation de poids n'atteint que 20% au cours des 30 jours suivants.
20 A la dose totale de 60 mg/kg, le poids moyen des souris diminue de $\pm 15\%$ en 15 jours. Les deux souris survivantes ne récupèrent leur poids initial qu'au jour 36 (figure 17).

Ces données indiquent que la dose de 60 mg/kg de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est proche de la LD₅₀, et que donc, la
25 β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est au moins 30 fois moins toxique que la DNR, en terme de toxicité aiguë après administration i.p., 5 jours consécutifs.

Toxicité par voie intraveineuse.

30 Tel qu'illustré à la figure 18, en ce qui concerne la DNR donnée par voie i.v. en administration unique à des souris NMRI femelles, aucune mortalité n'est observée aux faibles doses (10, 15 et 20 mg/kg). A 25 mg/kg, 6 souris meurent respectivement aux jours 12, 17, 20, 28, 34 et 42.
35 Aux concentrations plus élevées de DNR, la mortalité commence le jour 7 (1 souris sur 7 à la dose de 30 mg/kg) et au jour

- 6 (2 souris sur 7 à la dose de 35 mg/kg). Ces résultats sont conformes à ceux décrits précédemment (D. Deprez-De Campeneere and A. Trouet. *DNA-Anthracycline Complexes. I. Toxicity in mice and chemotherapeutic activity against L1210 Leukaemia of Daunorubicin-DNA and Adriamycin-DNA*, Eur. J. Cancer, 16 (1980), pp. 981-986).

Les résultats de la figure 19 indiquent que la perte pondérale moyenne est maximale au jour 7 et est d'autant plus importante que la dose administrée est élevée. les souris survivantes aux doses de 30 et 35 mg/kg ne récupèrent pas leur poids initial 30 jours après l'injection i.v. de la DNR.

Quand la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est administrée pour voie i.v. à la dose de 30 mg/kg, aucune mortalité n'est observée, et le poids moyen des souris augmente de $\pm 40\%$ en 40 jours (figure 20). Le poids moyen des souris à la fin de l'expérience est similaire à celui observé à la même dose de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR administrée par voie i.p. Par contre, à la dose de 60 g/kg, 2 souris meurent endéans les 5 minute après l'injection. Cette mortalité peut être due à une hypervolémie suite à l'injection beaucoup trop rapide du produit. Les 3 souris survivantes, après un léger amaigrissement jusqu'au jour 2, récupèrent leur poids initial, puis augmentent de poids ($\pm 30\%$ en 40 jours). A la dose de 120 mg/kg, les 5 souris meurent endéans les 7 minutes suivant l'injection, avec des signes cliniques de toxicité.

Quand la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR est administrée pour voie i.v. à la dose totale de 60 mg/kg, fractionnée en deux injections i.v. de 30 mg/kg chacune, deux jours consécutifs, aucune mortalité n'est observée. Il n'y a pas de différence dans l'évolution du poids moyen des souris ayant reçu 1 fois 30 mg/kg et celles ayant reçu 2 fois 30 mg/kg de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR (figure 21).

3. Conclusions.

Les résultats obtenus permettent de conclure que tant par voie intraveineuse que par voie intrapéritonéale, la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR a une toxicité aiguë beaucoup moins élevée que celle de la DNR, en terme de létalité. Ces résultats confirment la réduction de toxicité du dérivé β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR.

Des expériences identiques à celles décrites ci-dessus ont été réalisées avec des dérivés de doxorubicine.

Exemple 12.

Accumulation sur cellules tumorales MCF7/6 et cellules non tumorales MRC5 de la DOX, de la L-Leu-DOX et de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX.

Les cellules du carcinome mammaire humain MCF7/6 et de la lignée de fibroblastes humains MRC5 ont été incubées en présence de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX à une concentration de 10 μ g eq. DOX/ml. Après divers temps, l'accumulation des prodrogues et de leurs métabolites fluorescents a été déterminée par HPLC après extraction des produits à pH basique, selon une méthode mise au point au laboratoire. Les accumulations, exprimés en μ g/mg de protéines cellulaires, ont été comparées à celles de la DOX et de L-Leu-DOX. Les métabolites ont été identifiés par détermination des temps de rétention de produits de référence synthétisés au laboratoire.

La DOX s'accumule principalement dans les cellules MCF7/6 essentiellement sous forme inchangée, et après 6 heures, un taux intracellulaire de 6,9 μ g/mg de protéines cellulaires est atteint (figure 23).

| | | Accumulation après 6 h ($\mu\text{g}/\text{mg}$ prot. cellulaires) | | | IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (72 h) |
|---|---------------------------|--|---------|-------|---|
| | | $\beta\text{A-L-A-L-DOX}$ | Leu-DOX | DOX | |
| 5 | MCF7/6 DOX | - | - | 6,90 | 0,0025 |
| | Leu-DOX | - | 1,10 | 0,25 | 0,02 |
| | $\beta\text{A-L-A-L-DOX}$ | 0,10 | 0,65 | 0,22 | 3,0 |
| | MRC5 DOX | - | - | 11,20 | 0,018 |
| | Leu-DOX | - | 1,40 | 0,30 | 0,3 |
| | $\beta\text{A-L-A-L-DOX}$ | 0,10 | 0,10 | 0,01 | 120 |

La Leu-DOX et la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX s'accumulent respectivement 6 fois et 69 fois moins que la DOX après 6 heures. Intracellulairement, les taux de DOX sont 31 fois moins élevés après incubation des cellules en présence de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX (figures 24 et 25).

Dans les cellules de fibroblastes MRC5, incubées pendant 6 heures en présence des anthracyclines à la concentration de 10 μg eq. DOX/ml, la DOX s'accumule essentiellement sous forme inchangée et l'accumulation atteint un taux de $\pm 11,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires après 6 heures (figure 26).

La L-Leu-DOX s'accumule à des taux moindres, l'accumulation atteignant 1,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires. Le métabolite principal est la DOX (0,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires) (figure 27).

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX s'accumule 112 fois moins que la DOX après 6 heures. Intracellulairement, les taux de DOX sont 1100 fois moins élevés après incubation des cellules en présence de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX (figure 28).

Ces résultats montrent qu'en tant que telle, la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX ne rentre pratiquement pas dans les cellules, et qu'elle doit préalablement être hydrolysée dans le milieu extérieur sous forme de Leu-DOX avant de rentrer

dans les cellules où intracellulairement la Leu-DOX peut ensuite générer la DOX (figure 22).

Ces résultats montrent également que les taux intracellulaires de l'agent thérapeutique actif sont deux
5 fois plus élevés dans les cellules normales que dans les cellules tumorales dans le cas de la DOX. Par contre, dans le cas de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX, les taux intracellulaires de DOX sont 22 fois plus élevés dans les cellules tumorales MCF7 comparativement aux cellules non tumorales MRC5.

10

Exemple 13.

Cytotoxicité in vitro vis-à-vis des cellules tumorales MCF7/6 et des cellules non tumorales MRC5.

Les cytotoxicités de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX, de
15 la L-Leu-DOX et de la DOX ont été déterminées sur cellules MCF7/6 et MRC5 en croissance dans des boîtes à 96 puits, incubées en présence de concentrations croissantes des divers composés. Après 72 heures, les cellules sont incubées pendant 48 heures en absence d'anthracycline et la cytotoxicité est
20 déterminée par mesure des protéines cellulaires par la technique de Bradford. Une gamme de 9 concentrations sont utilisées, allant de 700 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à 0,0035 $\mu\text{g/ml}$, et chaque mesure représente une moyenne et une déviation standard de 6 valeurs. Les points expérimentaux sont ajustés
25 à une courbe sigmoïde qui permet de calculer le point d'inflexion correspondant à la dose à laquelle la moitié des cellules survivent (IC_{50}).

Le tableau de l'exemple 12 reprend les IC_{50} qui sont respectivement de 0,0025, 0,020 et 3,0 $\mu\text{g/ml}$
30 respectivement pour la DOX, la L-Leu-DOX et la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX pour les cellules du carcinome mammaire humain MCF7/6. Pour les cellules de la lignée de fibroblastes humains MRC5, les valeurs sont respectivement de 0,018, 0,30 et 120 $\mu\text{g/ml}$.

35 Ces résultats indiquent que la Leu-DOX et la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX sont respectivement 8 fois et 1000 fois moins

cytotoxiques que la DOX pour les cellules du carcinome mammaire humain MCF7/6 fibroblastiques maintenues en croissance pendant 72 heures en présence des anthracyclines. En ce qui concerne les cellules MRC5, la Leu-DOX et la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX sont respectivement 17 fois et 6700 fois moins cytotoxiques que la DOX pour les cellules maintenues en croissance pendant 72 heures en présence des anthracyclines.

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX est 40 fois plus toxique pour les cellules tumorales MCF7 que pour les cellules non tumorales MRC5. Ceci est à mettre en relation avec les taux intracellulaires plus importants de DOX qui ont été observés dans les cellules MCF7 incubées en présence de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX (figures 29 et 30).

Le composé est généralement caractérisé par une plus grande activité sur les modèles de tumeurs solides (par exemple par injection des cellules tumorales par voie sous-cutanée) que sur les modèles de type "leucémique" obtenus après injection intraveineuse des cellules tumorales.

Les cellules tumorales injectées par voie sous-cutanée forment une tumeur solide à l'endroit de l'injection et la concentration locale des hydrolases sécrétées par ces cellules restera importante. Quand les cellules tumorales sont injectées par voie intraveineuse, les hydrolases qu'elles sécrètent seront immédiatement diluées dans le flux sanguin.

Exemple 14.

Toxicité aiguë in vivo.

En outre, l'administration de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX à des souris athymiques auxquelles on a implanté une tumeur mammaire humaine MCF7/6 réduit l'évolution de la tumeur cancéreuse (figure 31) sans affecter de manière importante le poids moyen des souris traitées (figure 32).

Ces expérimentations ont été faites selon les protocoles décrits dans l'exemple 11.

Les Inventeurs ont également caractérisé la (les) protéase(s) secrétée(s) dans le milieu extracellulaire de cellules de carcinome mammaire humain qui peut (peuvent) hydrolyser la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX. Il se confirme que cette
5 (ces) protéase(s) ne correspond(ent) à aucune protéase décrite jusqu'à présent.

En effet, l'enzyme nommé provisoirement "COUM" est une métalloprotéase inhibable par les chélateurs de métaux tels que l'EDTA et nécessite pour son activité l'ion cobalt.
10 Son pH optimum se situe entre 7,5 et 8,0, ce qui exclut que ce soit une cathepsine.

Par chromatographie à haute performance et par électrophorèse en présence de sulfate de lauryle, plusieurs bandes de poids moléculaire plus élevés que 70 kD sont
15 observées.

La figure 33 représente la mesure de l'expression de la coumarine dans des tubes à essai comportant le composé selon l'invention dans des homogénats de cellules tumorales (de cancer du poumon, du sein, des ovaires, ...), de
20 cellules transformées (lignée de cellules normales immortalisées mais non cancéreuses) ainsi que de cellules normales (fibroblastes et cellules musculaires).

Il est donc possible, en utilisant le composé selon l'invention, de diagnostiquer par l'expression du marqueur
25 des tumeurs cancéreuses, et d'améliorer ainsi le diagnostic du cancer, l'étude de l'évolution de la tumeur, le dosage des facteurs sécrétés par les cellules tumorales,

Le composé selon l'invention peut être inclus dans un dispositif de diagnostic et/ou de dosage comprenant
30 différents réactifs bien connus de l'Homme du Métier.

Le dispositif de diagnostic de l'invention peut être utilisé dans un procédé de diagnostic et/ou de dosage hystologique ou biochimique comprenant le prélèvement chez un patient de tissus, de cellules ou d'un liquide
35 physiologique, leur mise en contact avec le composé selon l'invention dans des conditions permettant l'expression du

marqueur libre (impliquant éventuellement un ou plusieurs réactifs intermédiaires) et la détection et/ou la quantification du marqueur libéré.

REVENDICATIONS.

1. Composé (W-Z-M) comprenant un élément (M) choisi
parmi le groupe constitué par les marqueurs et les agents
5 thérapeutiques possédant un site actif intracellulaire
(S.A.), lié à un ligand (W-Z), comprenant un bras (Z) lié à
un groupement terminal (W), caractérisé en ce que la liaison
entre le bras (Z) du ligand (W-Z) et l'élément (M) empêche
la pénétration intracellulaire du composé (W-Z-M) et/ou
10 inhibe l'expression du marqueur (M), en ce que ladite liaison
est clivable sélectivement par des facteurs sécrétés par des
cellules cibles de manière à permettre l'expression du
marqueur (M) ou la pénétration de l'agent thérapeutique (M)
dans lesdites cellules cibles, et en ce que le groupement (W)
15 assure la stabilité du composé (W-Z-M) dans le sérum et le
sang circulant.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé
en ce que le groupement terminal (W) est choisi parmi le
groupe constitué par les acides aminés non présents chez les
20 mammifères ou un groupement succinyl.

3. Composé selon la revendication 2, caractérisé
en ce que le groupement terminal (W) est la β -Alanine de
formule :



25 4. Composé selon l'une quelconque des
revendications précédentes, caractérisé en ce que la liaison
entre l'élément (M) et le bras (Z) du ligand (W-Z) est un
lien peptidique.

5. Composé selon l'une quelconque des
30 revendications précédentes, caractérisé en ce que le bras (Z)
du ligand (W-Z) est un peptide constitué d'au moins deux
acides aminés éventuellement substitués.

6. Composé selon la revendication 5, caractérisé
en ce que le bras (Z) du ligand (W-Z) est choisi parmi le
35 groupe constitué par les séquences peptidiques suivantes :
L-Leucyl-L-Alanyl-L-Leucyl-, L-Leucyl-L-Alanyl-, L-Alanyl-L-

Leucyl-L-Phénylalanyl-, L-Alanyl-L-Leucyl-.

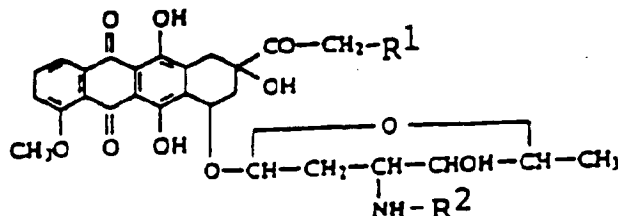
7. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les agents thérapeutiques sont des agents thérapeutiques antitumoraux et que les cellules cibles sont des cellules tumorales.

8. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les agents thérapeutiques sont des anti-inflammatoires et que les cellules cibles sont des macrophages ou des monocytes.

9. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique (M) est choisi parmi le groupe constitué par les anthracyclines, les dérivés d'acide folique, les alcaloïdes vinca, la calichéamycine, le mitoxanthrone, les cytosine arabinosides (ARA-C) ou adénosine arabinosides (ARA-A), le fludarabine phosphate, le melphalan, la bléomycine, la mitomycine, la L-canavanine, les taxoïdes, la camptothécine et leurs dérivés, en particulier le TOPOTECAN ® (hydrochlorure de 9-diméthylaminométhyle-10-hydroxy camptothécine), les dérivés de fluorochromes, en particulier la rhodamine 123, et leurs dérivés, éventuellement liés à un acide aminé substitué ou non.

10. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique (M) est la doxorubicine ou la daunorubicine, éventuellement liées à un acide aminé substitué ou non.

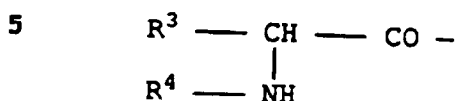
11. Composé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique correspond à la formule générale :



35

dans laquelle :

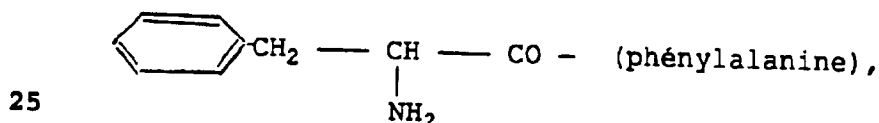
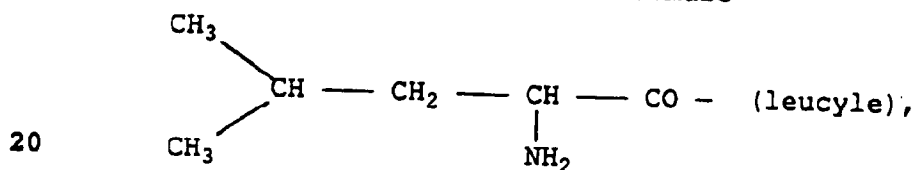
- R¹ est un atome d'hydrogène ou un groupement OH,
- R² est un atome d'hydrogène ou un radical de formule



dans laquelle :

- 10 - R³ est un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, éventuellement substitué,
- R⁴ représente un atome d'hydrogène ou forme avec R³ un radical alkylène comportant 3 ou 4 atomes de carbone.

12. Composé selon la revendication 11, caractérisé en ce que R² est un radical de formule



ou un de leurs isomères.

13. Composition pharmaceutique comprenant le composé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 12 et éventuellement un adjuvant ou véhicule pharmaceutique acceptable.

14. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 13, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des tumeurs cancéreuses.

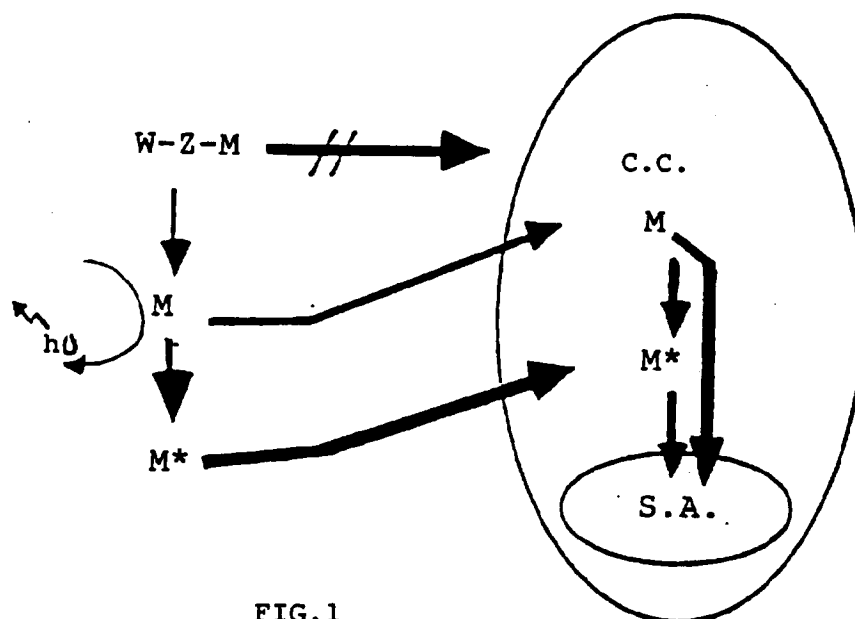
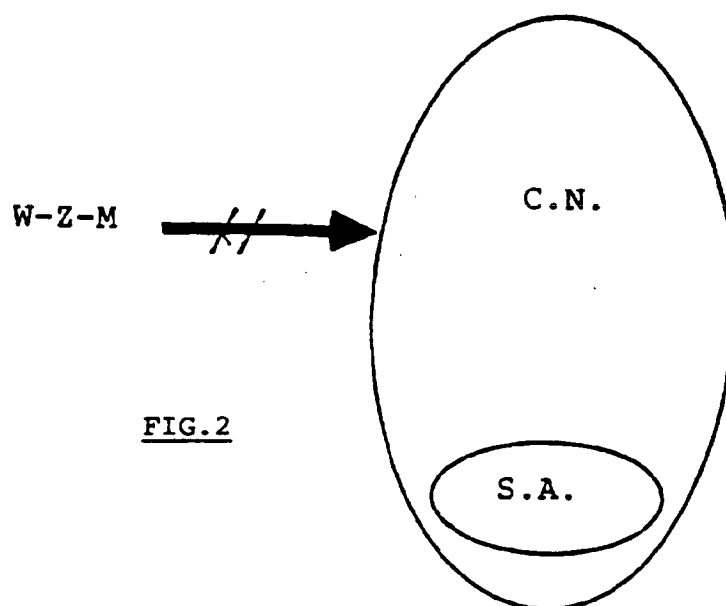
15. Procédé de traitement thérapeutique de tumeurs cancéreuses, caractérisé en ce qu'il consiste en l'administration de la composition selon la revendication 13 à un patient.

16. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 13 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des réactions inflammatoires, de préférence des rhumatismes.

5 17. Procédé de traitement thérapeutique de réactions inflammatoires, notamment de rhumatisme, caractérisé en ce qu'il consiste en l'administration de la composition selon la revendication 13 à un patient.

10 18. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le marqueur est choisi parmi le groupe constitué par la coumarine, la 7-amido-4-trifluorométhyle coumarine, la paranitroanilide, la β -naphtylamide et la 4-méthoxy- β -naphtylamide.

15 19. Dispositif de diagnostic et/ou de dosage comprenant le composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou selon la revendication 18.

FIG. 1FIG. 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

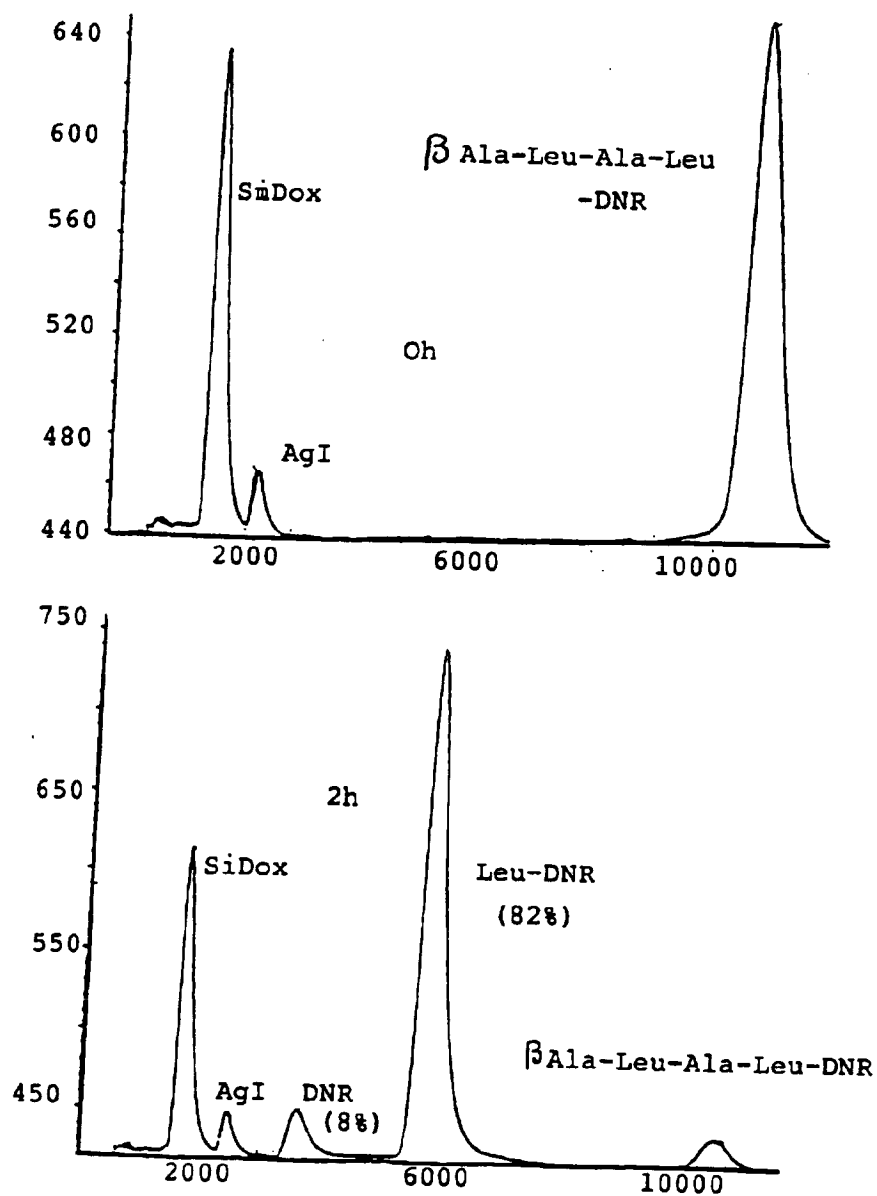
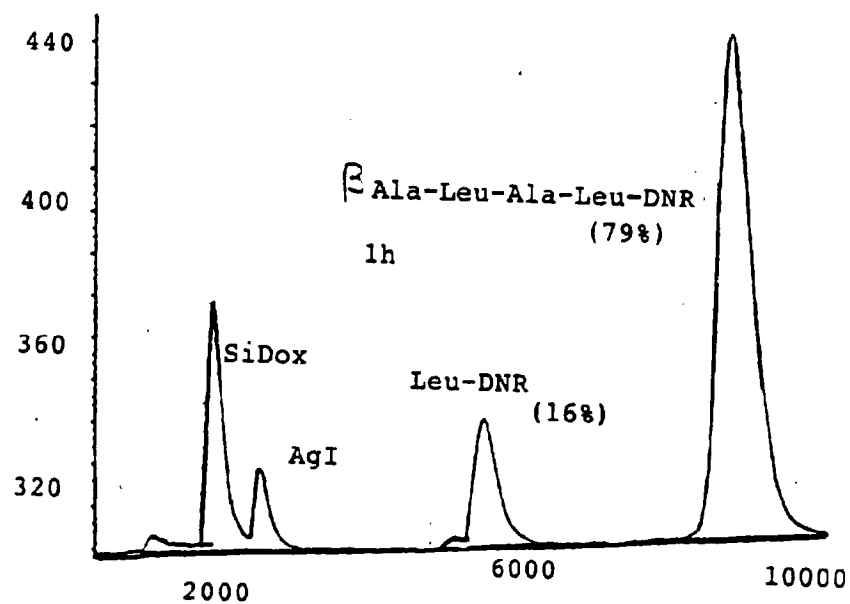
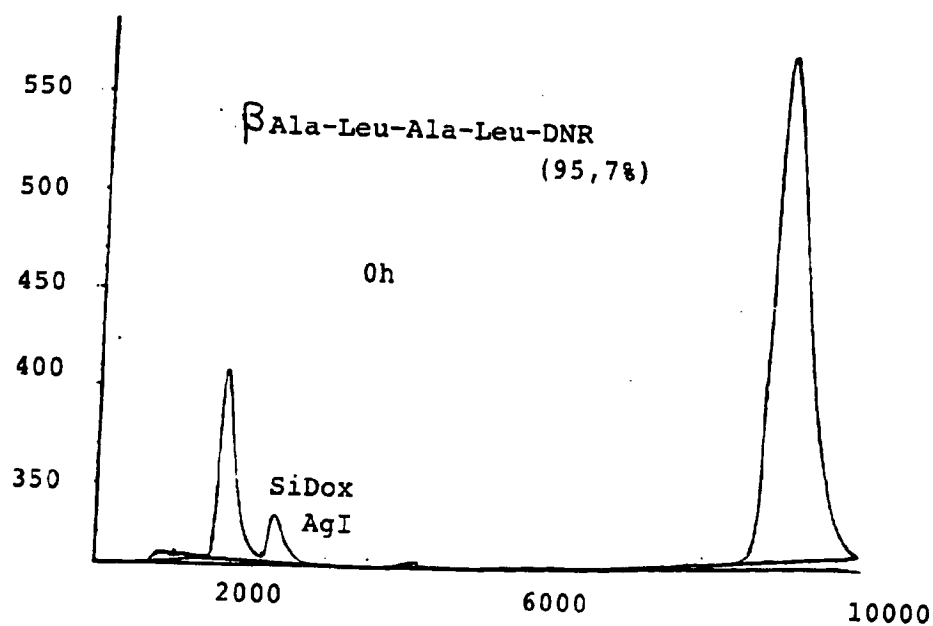
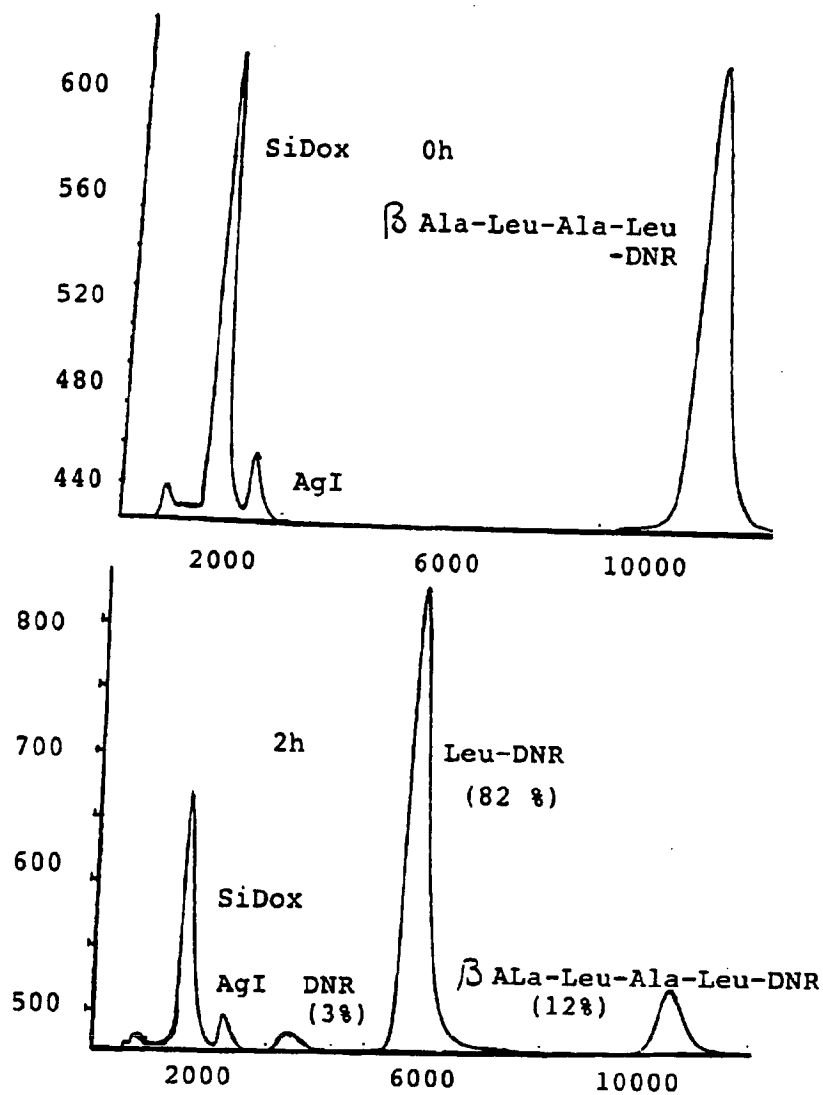


FIG. 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

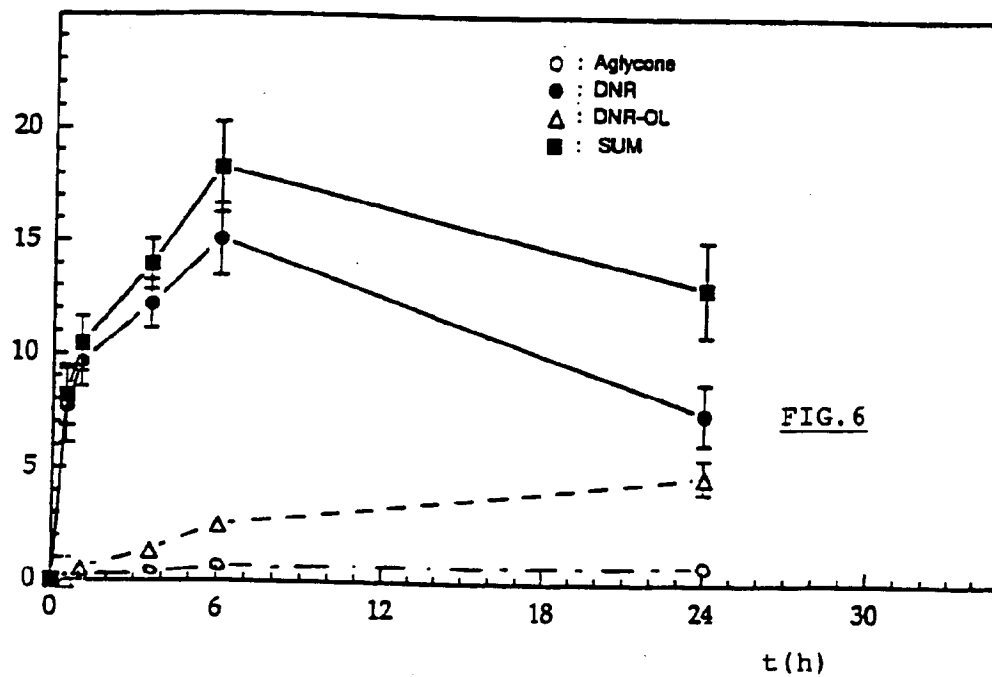
FIG. 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

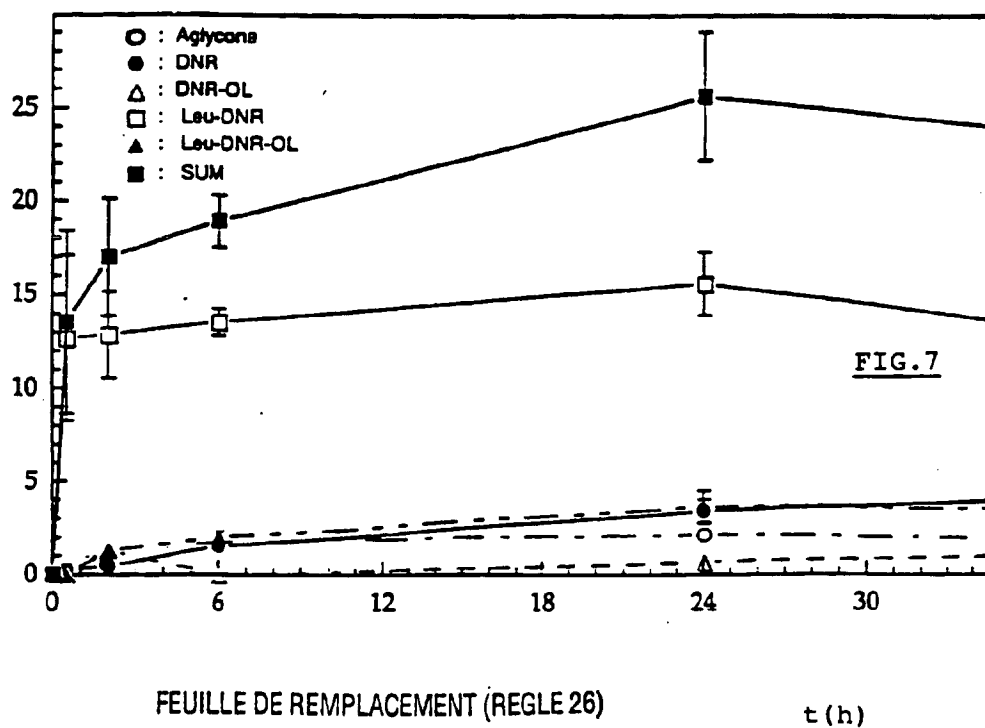
FIG. 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)



Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)

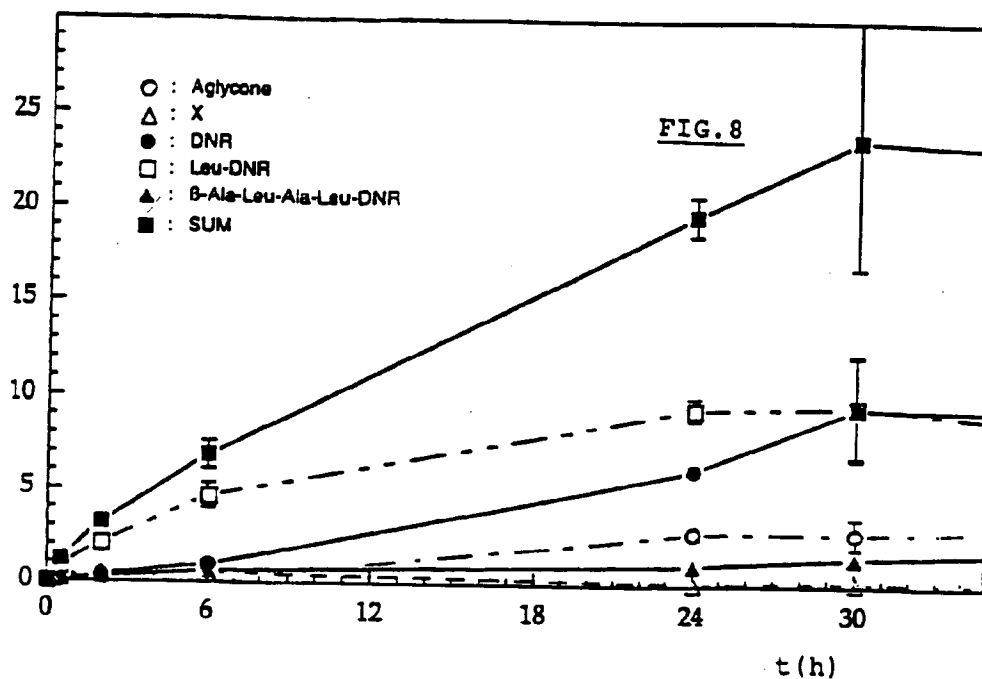


FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

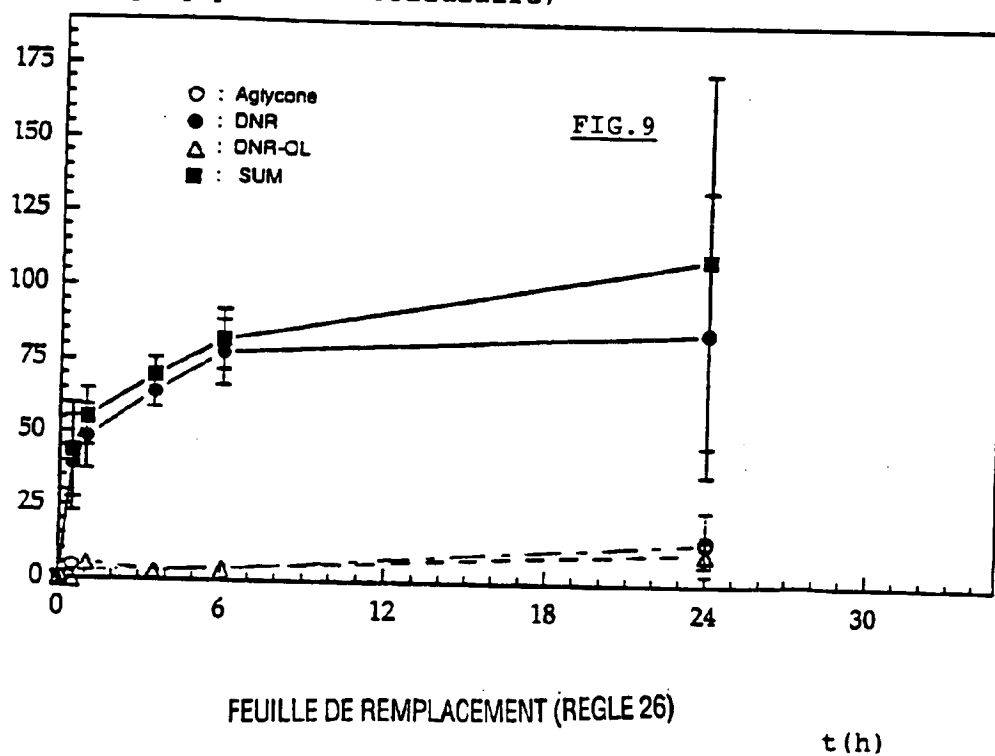
t (h)

6/19

Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)

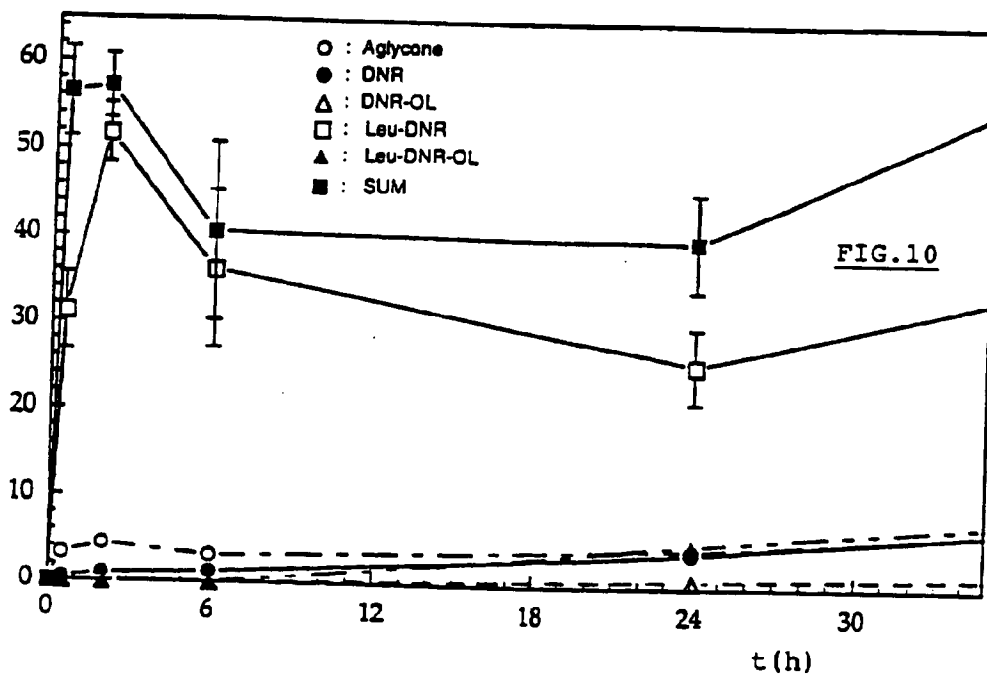


Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)

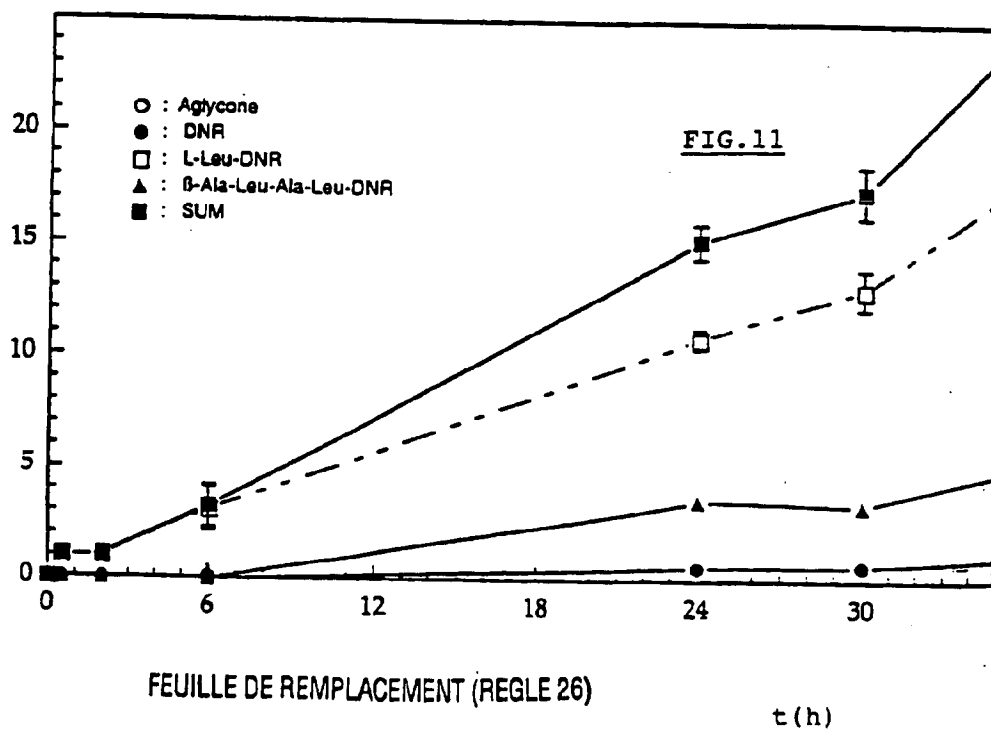


FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)



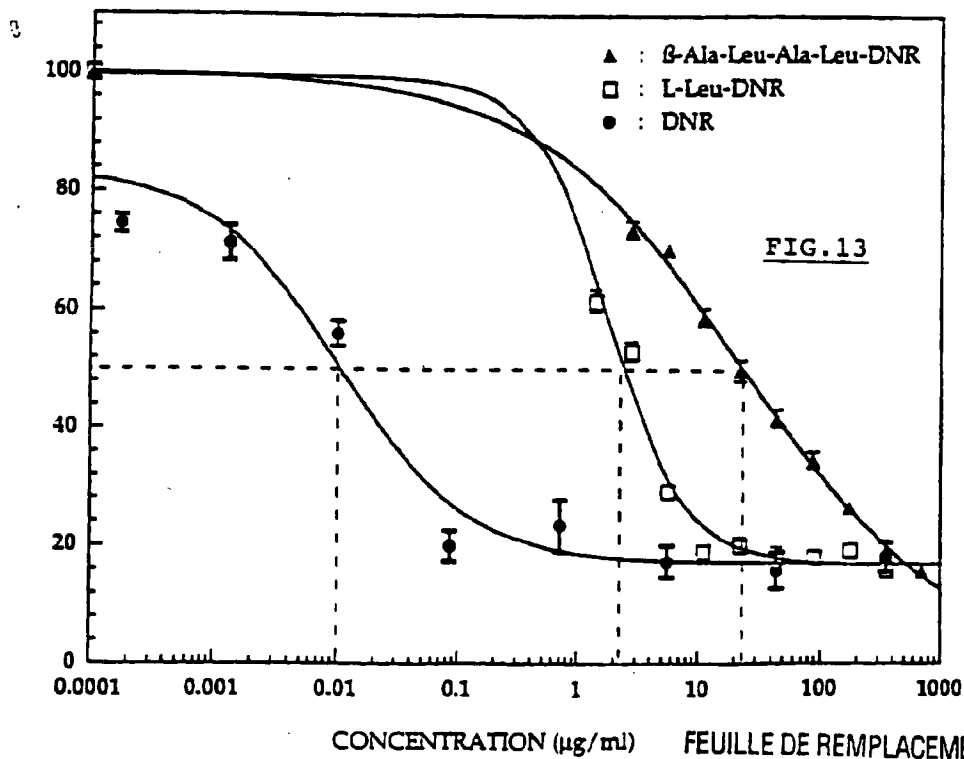
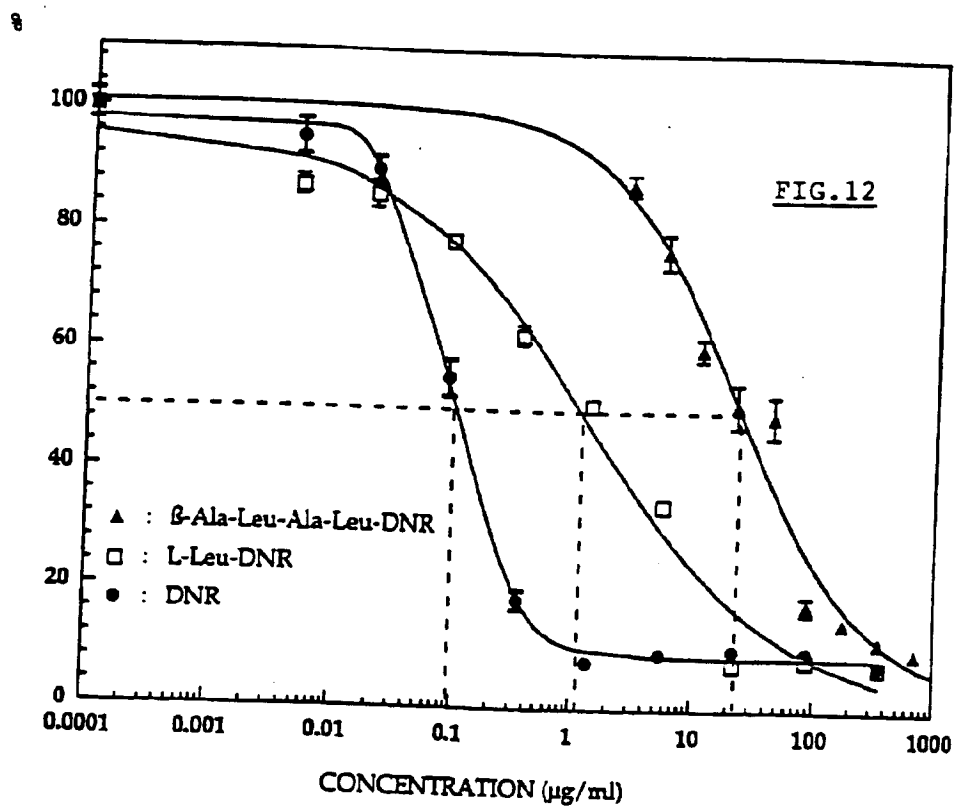
Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)



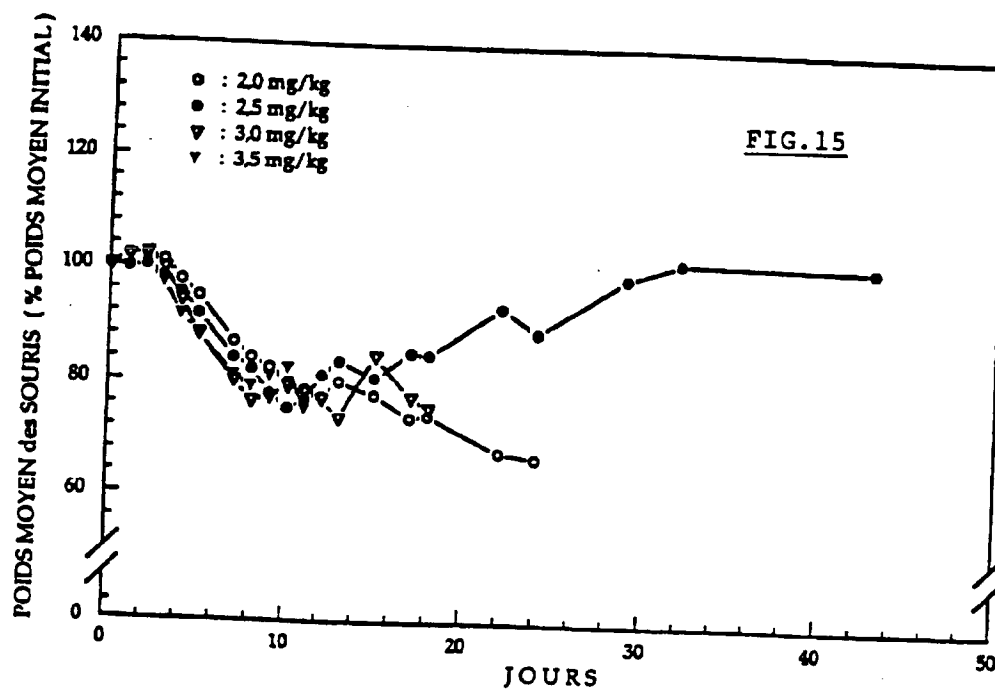
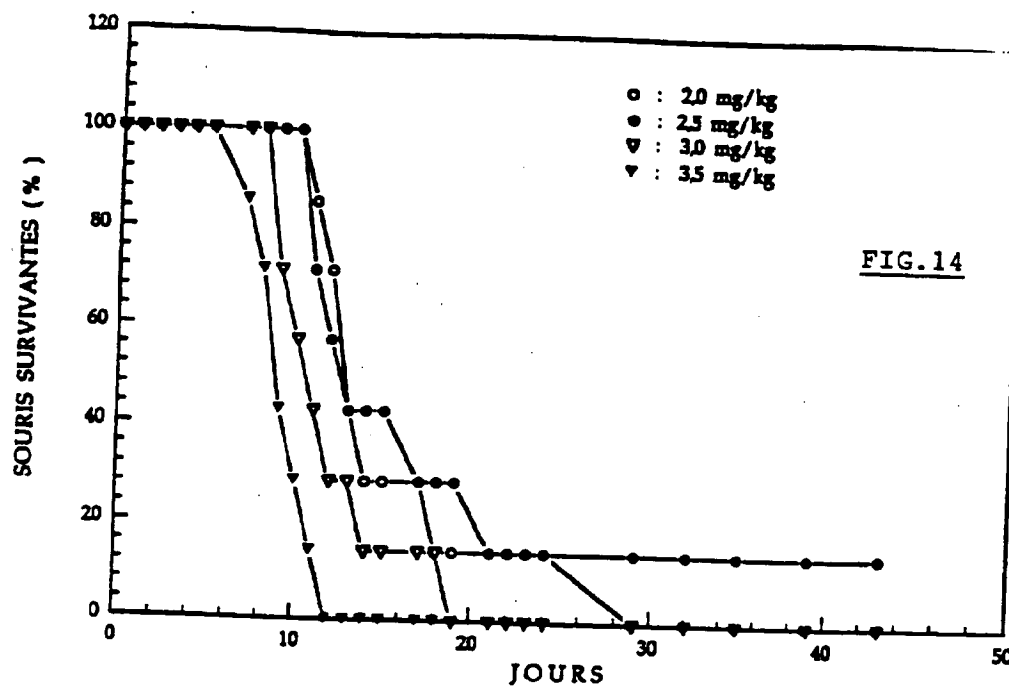
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

t (h)

8/19

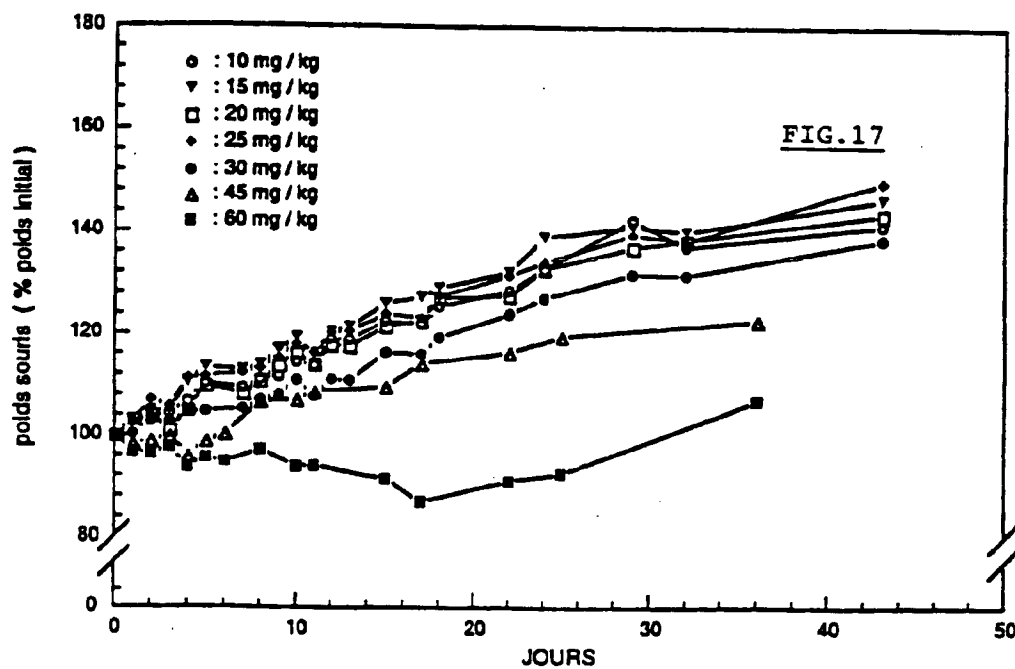
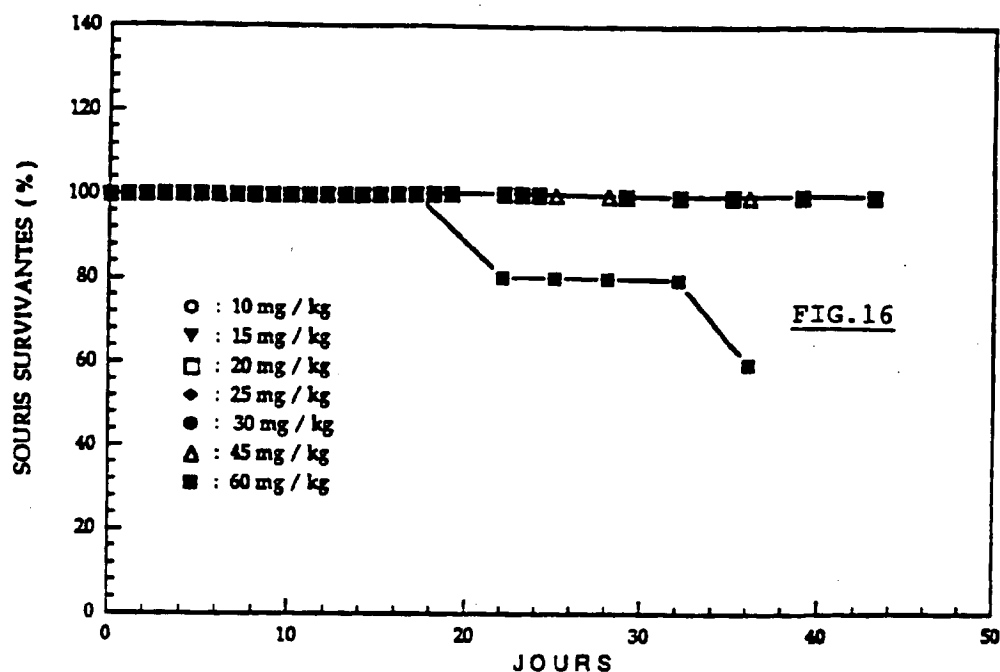


FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



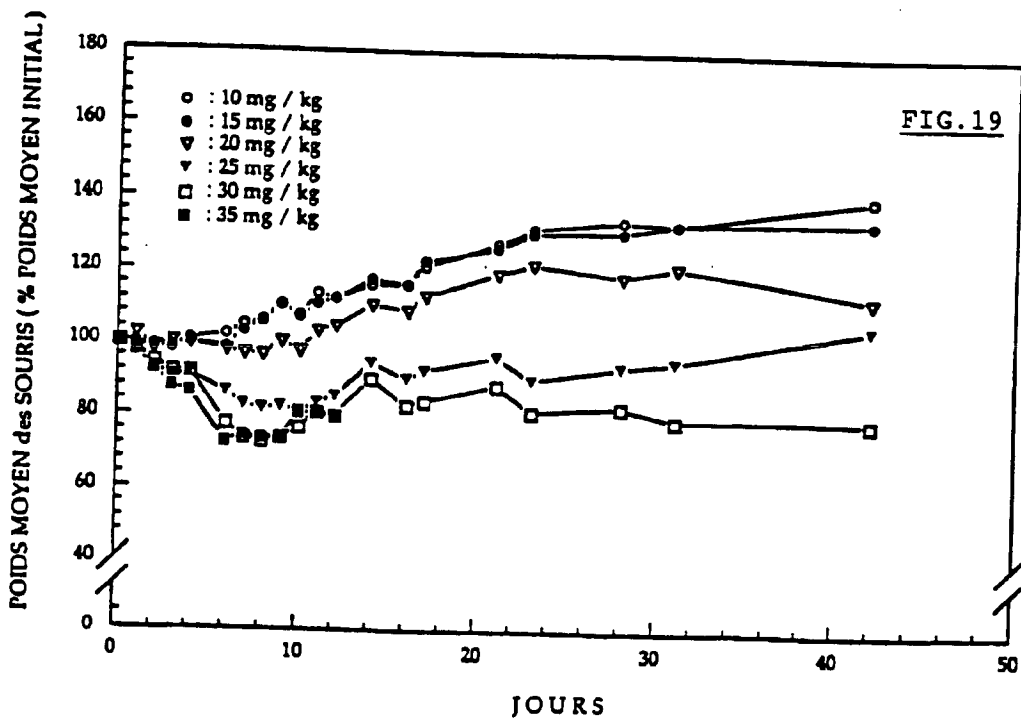
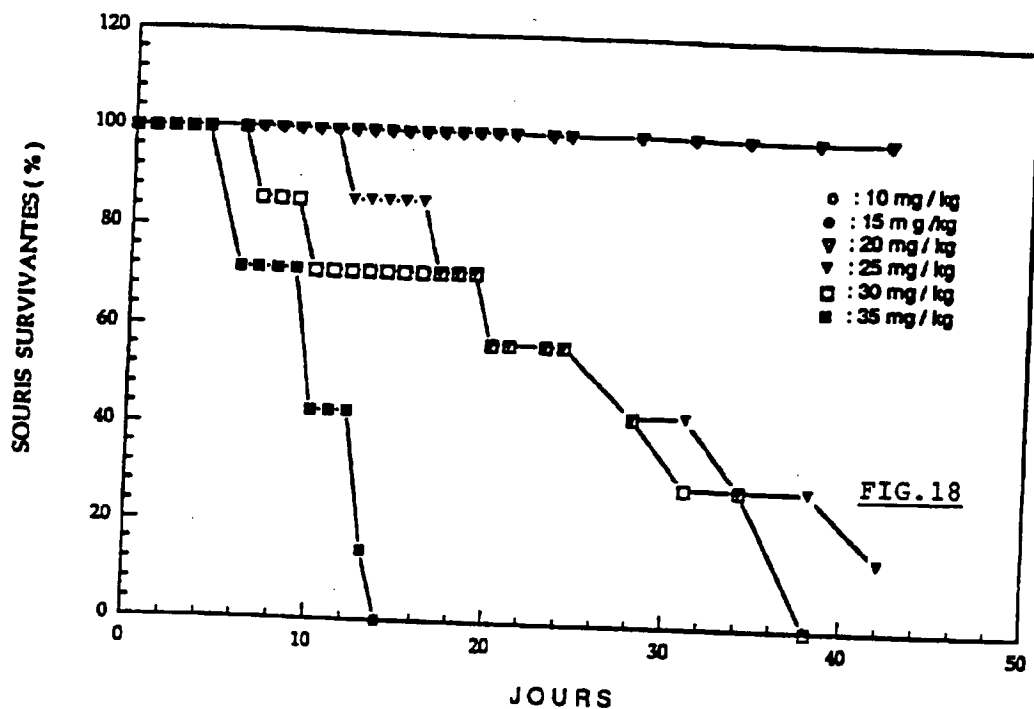
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

10/19



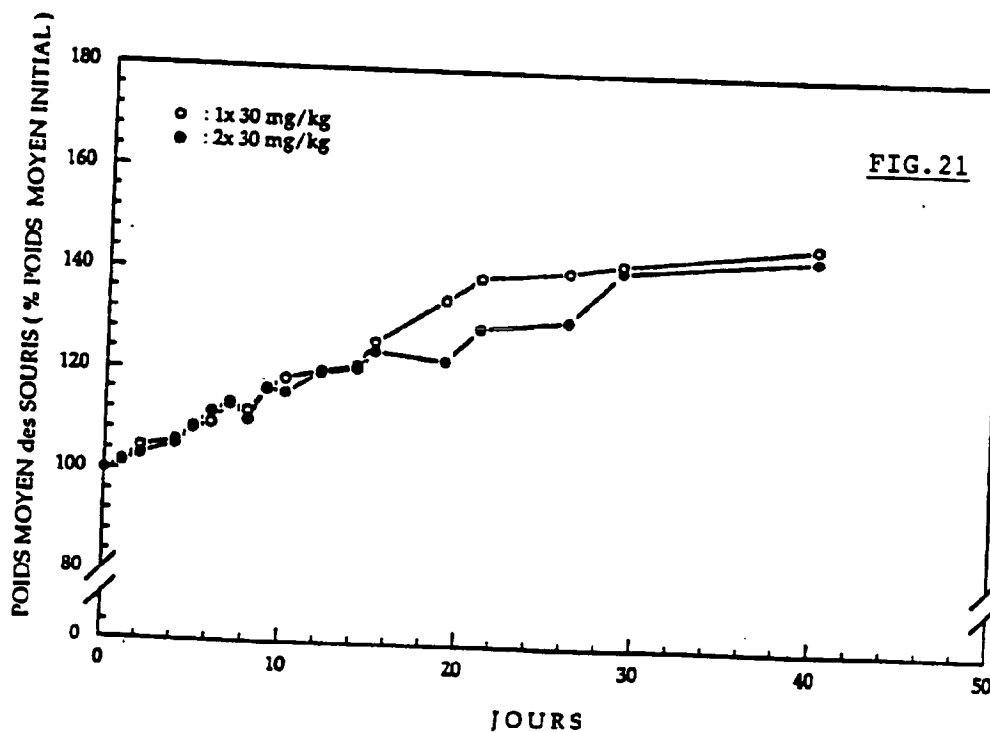
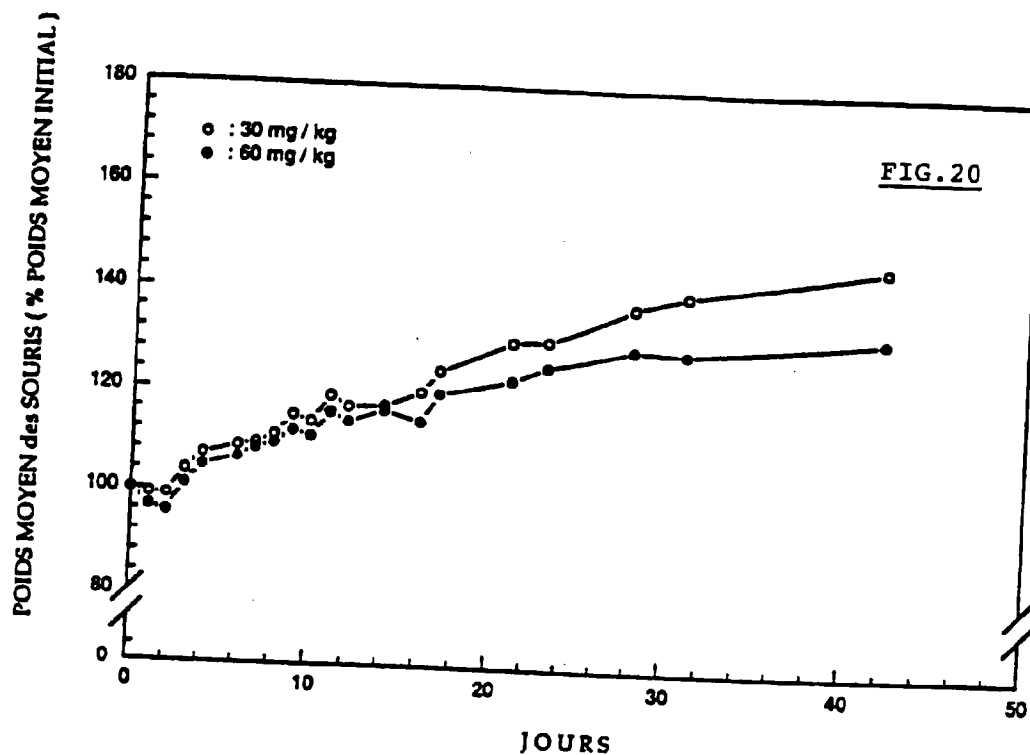
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/19

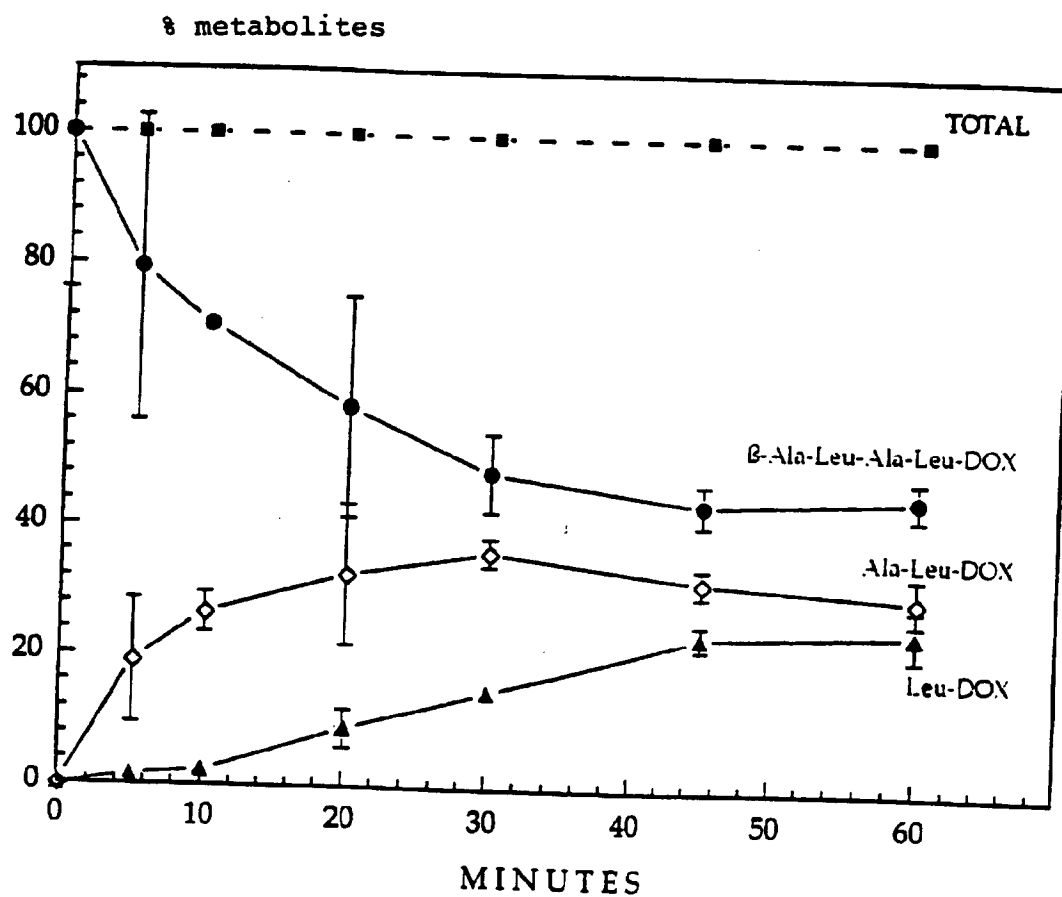


FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

12/19

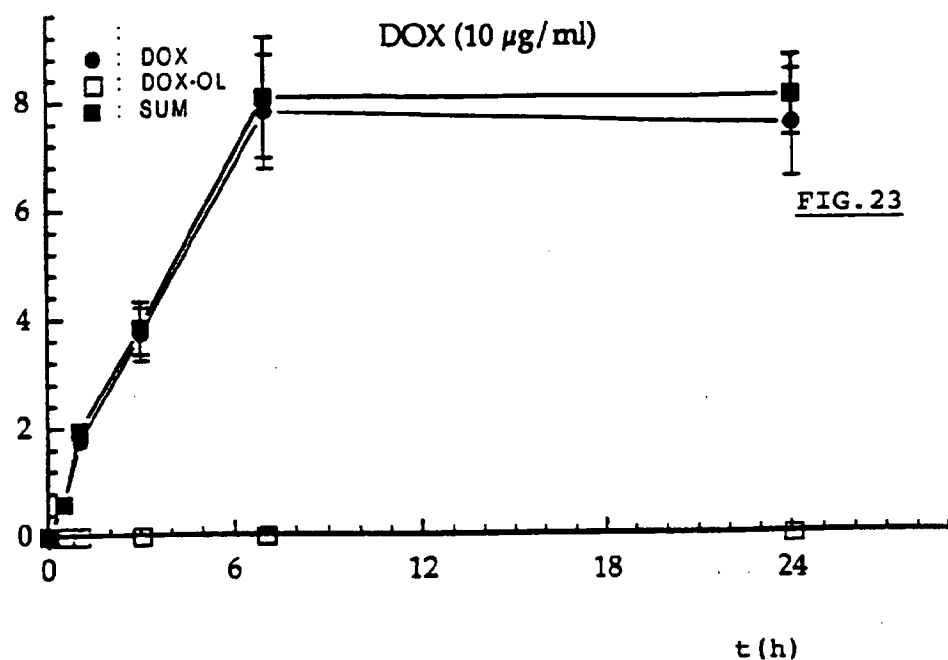


FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

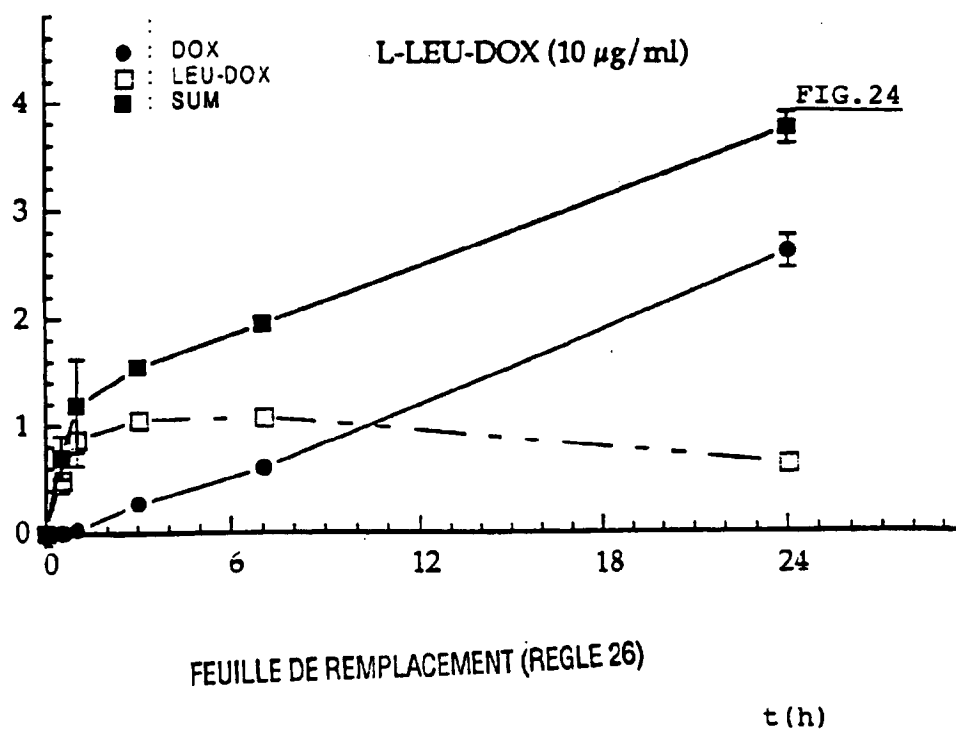
FIG.22

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)

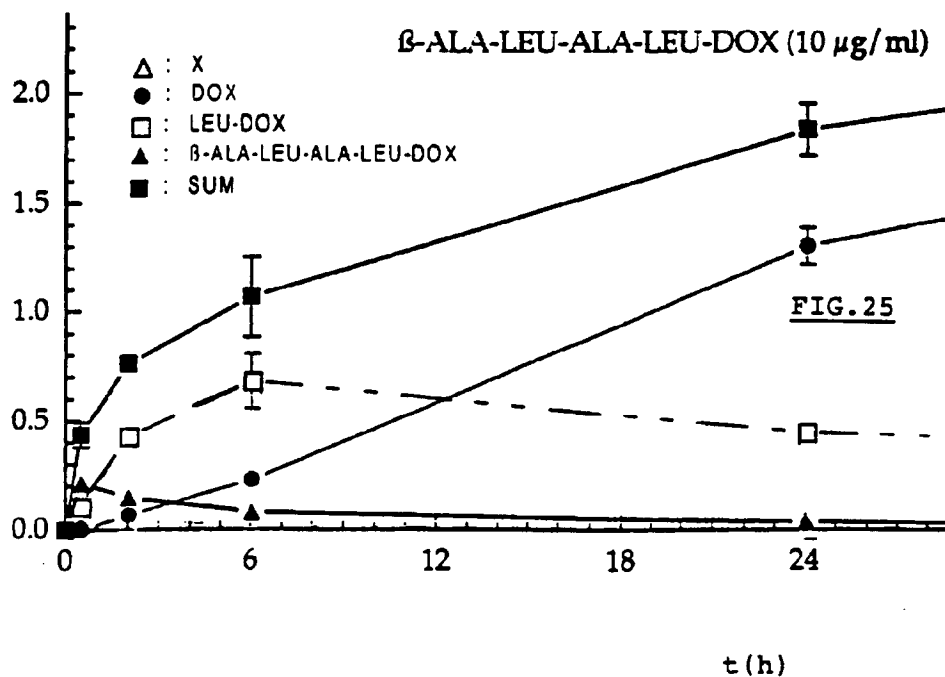


Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)

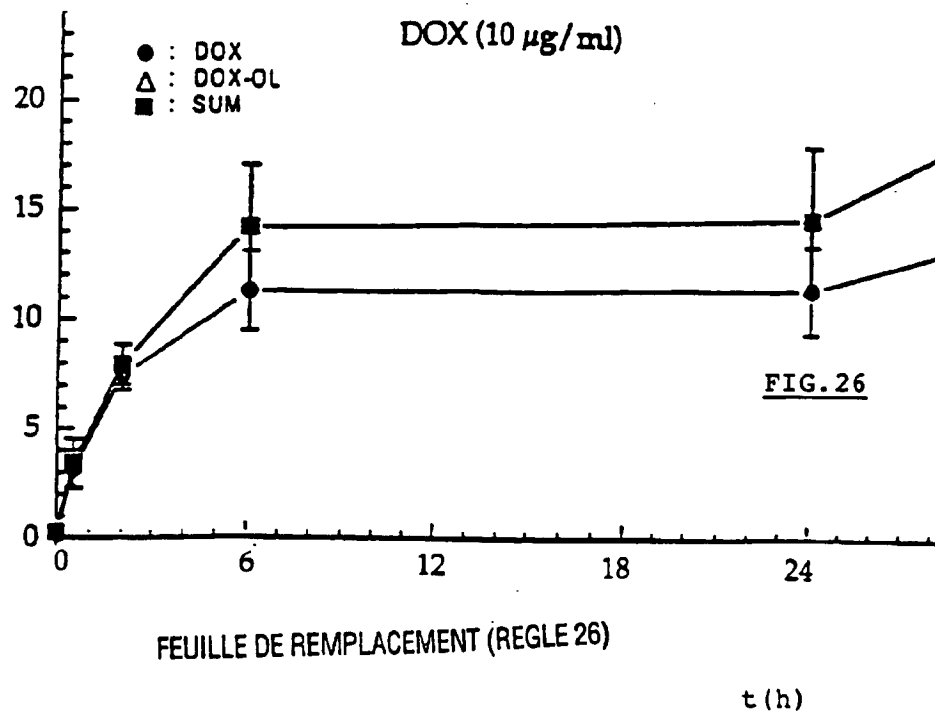


15/19

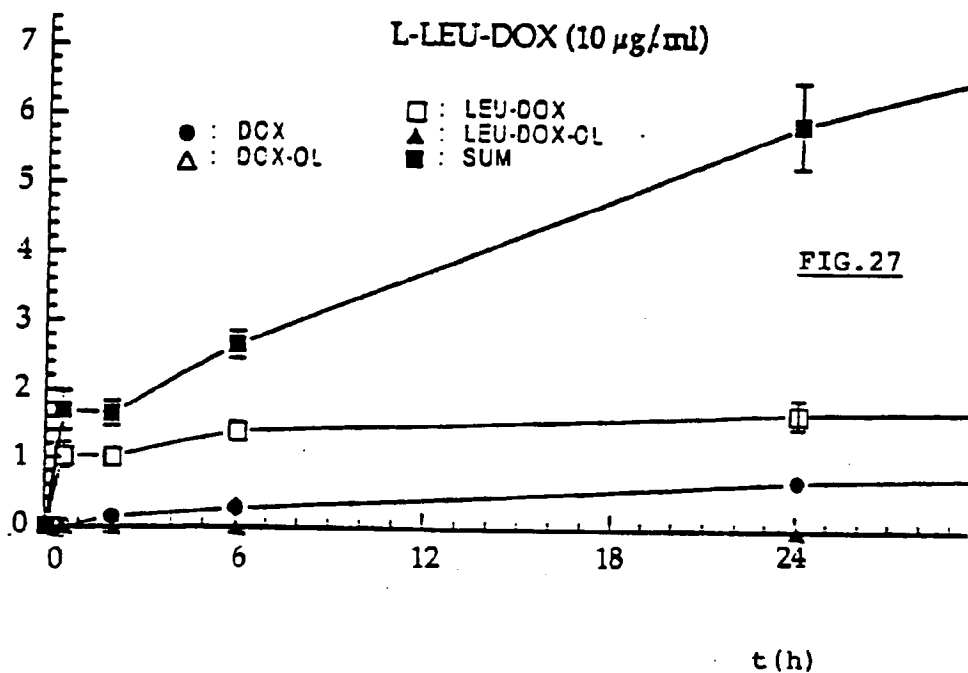
Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)



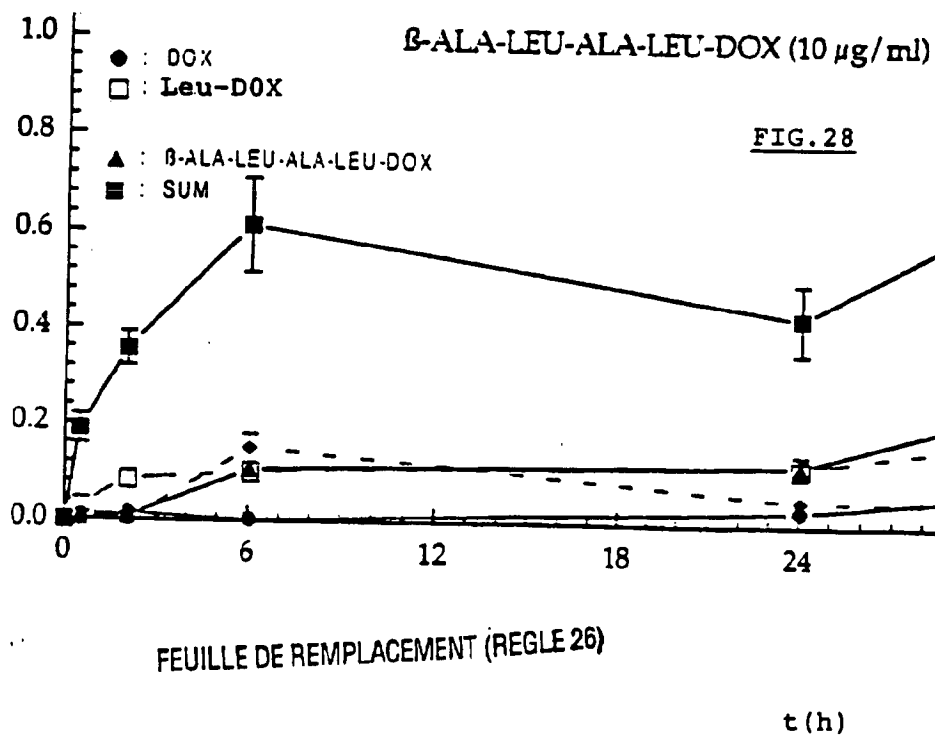
Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)



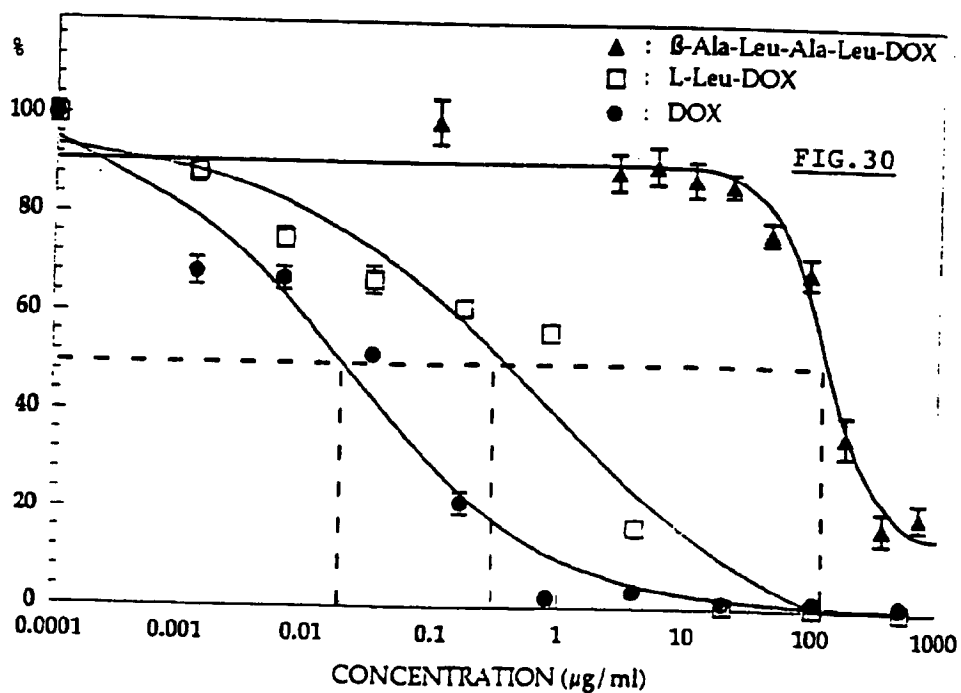
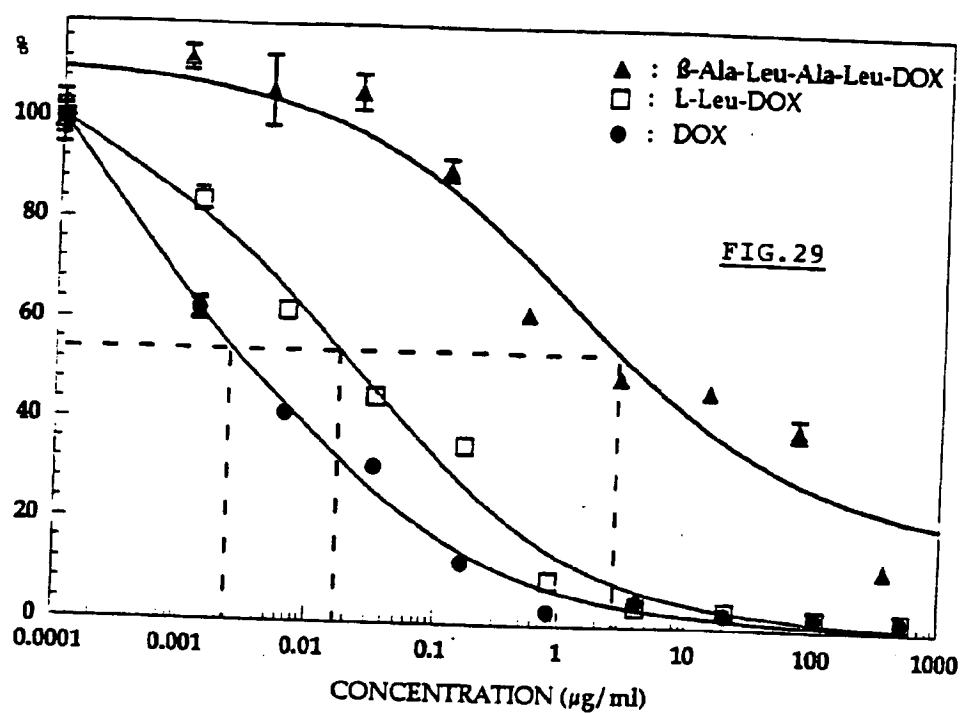
Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)



Accumulation du composé
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine cellulaire)



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

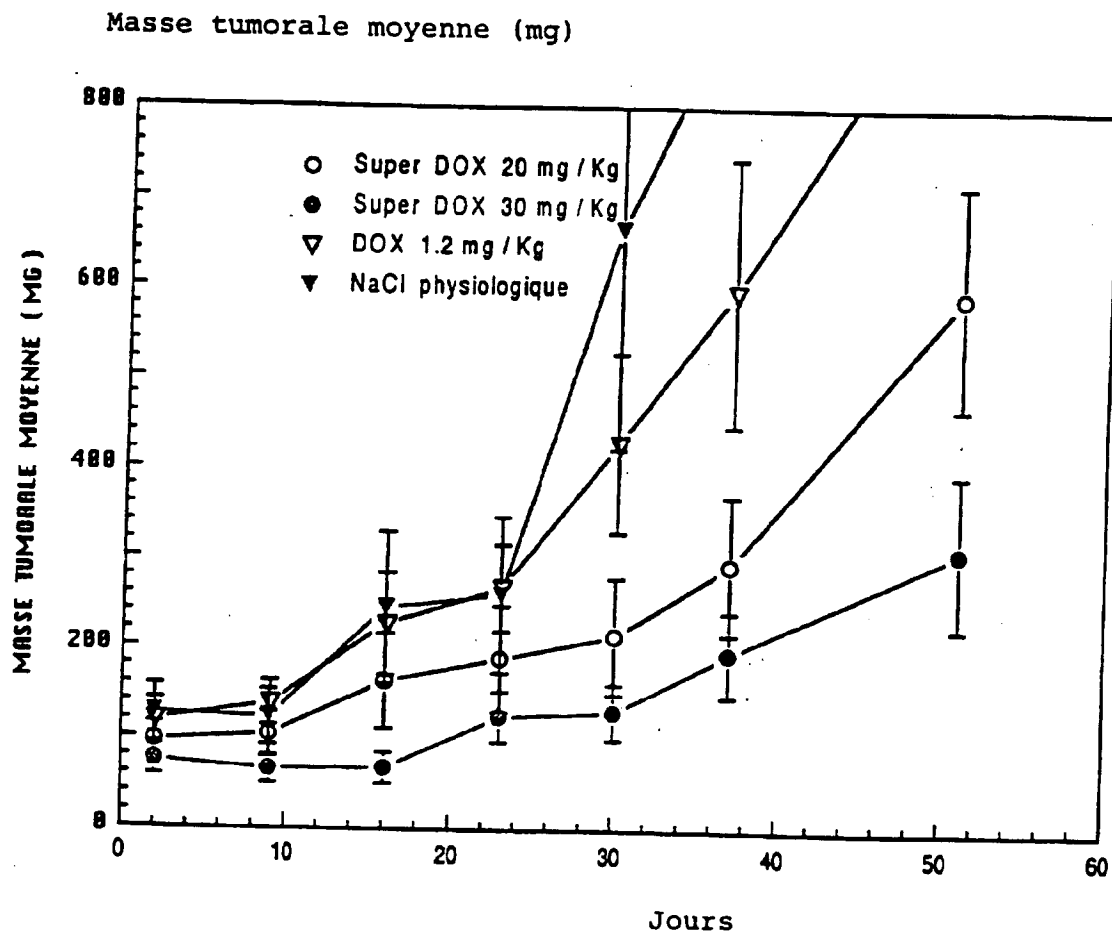


FIG. 31

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

19/19

Poids moyen des souris (g)

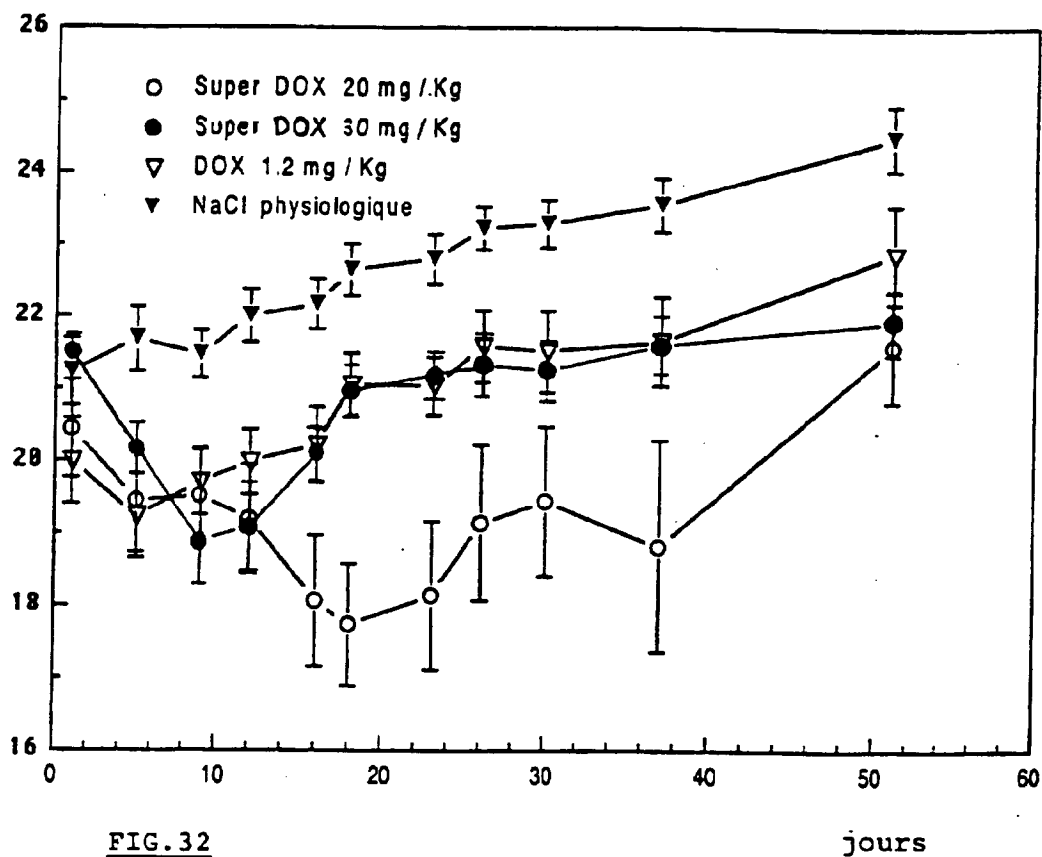


FIG.32

(nMoles COUM. libérées / min par mg Prot.Cell.)

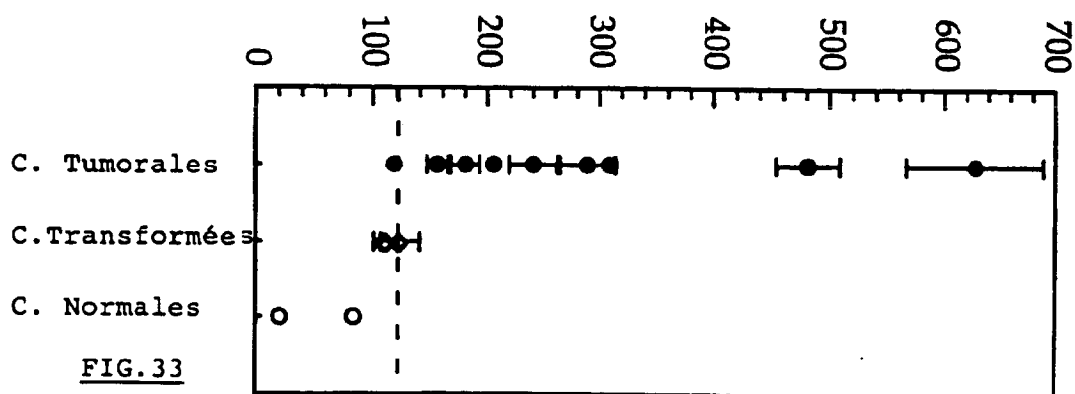


FIG.33

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/BE 95/00076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K47/48 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | BE,A,869 485 (INSTITUT INTERNAT. DE PATHOL. CELLUL. ET MOLECUL..) 1 December 1978 cited in the application see page 1, line 1 - line 36 see claims & US,A,4 296 105 --- -/-- | 1,2,4-19 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 1996

Date of mailing of the international search report

16. 01. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/BE 95/00076

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | <p>DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US AN=97:150636, BAURAIN, R. ET AL 'Antitumor activity of daunorubicin linked to proteins: lysosomal hydrolysis and antitumor activity of conjugates prepared with peptidic spacer arms' see abstract & CURR. CHEMOTHER. IMMUNOTHER., PROC. INT. CONGR. CHEMOTHER., 12TH (1982), MEETING DATE 1981, VOLUME 2, 1430-2. EDITOR(S): PERITI, PIERO;GIALDRONI GRASSI, GIULIANA. PUBLISHER: AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D. C. CODEN: 48HGAR,</p> | 1-19 |
| X | <p>EP,A,0 041 935 (OMNICHEM SA) 16 December 1981 see page 9, line 17 - line 19; claims; example 18; table III</p> | 1-4, 10, 11 |
| X | <p>EP,A,0 208 615 (IRE CELLTARG SA) 14 January 1987 see claims 7-14</p> | 1 |
| X | <p>EP,A,0 044 090 (MERCK & CO INC) 20 January 1982 *abstract* see page 4, line 1 - line 3; claims</p> | 1 |
| A | <p>BE,A,882 541 (PATHOLOGIE CELLULAIRE & MOLECU) 16 July 1980 see page 2, paragraph 1 - paragraph 2 see page 6, paragraph 2; claim 4; example 1</p> | 1 |
| X | <p>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 23, WASHINGTON US, pages 1171-1174, R. BAURAIN ET AL. 'AMINO ACID AND DIPEPTIDE DERIVATIVES OF DAUNORUBICIN. 2. CELLULAR PHARMACOLOGY AND ANTITUMOR ACTIVITY ON L1210 LEUKEMIC CELLS IN VITRO AND IN VIVO.' see table I</p> | 1,2, 5-17, 19 |
| X | <p>EP,A,0 126 685 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 28 November 1984 see page 1, line 34 - line 39 see page 13, line 7 - line 15</p> | 1,2, 5-17, 19 |
| -/-- | | |

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/BE 95/00076

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | J. CONTROLLED RELEASE (1994), 31(1), 89-97 CODEN: JCREEC; ISSN: 0168-3659, MARRE, ANNE DE ET AL 'Evaluation of the hydrolytic and enzymic stability of macromolecular Mitomycin C derivatives' see page 89, paragraph 1 see page 95, column 2, paragraph 2 --- | 1,6,9 |
| X | JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 23, WASHINGTON US, pages 1166-1170, M. MASQUELIER ET AL. 'AMINO ACIDS AND DIPEPTIDE DERIVATIVES OF DAUNORUBICIN. 1. SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, AND LYSOSOMAL DIGESTION.' see table I --- | 1,2, 4-17,19 |
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 97, no. 18, 1 November 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 150635, MASQUELIER, M. ET AL 'Antitumor activity of daunorubicin linked to proteins: biological and antitumor properties of peptidic derivatives of daunorubicin used as intermediates' see abstract & CURR. CHEMOTHER. IMMUNOTHER., PROC. INT. CONGR. CHEMOTHER., 12TH (1982), MEETING DATE 1981, VOLUME 2, 1428-30. EDITOR(S): PERITI, PIERO; GIALDRONI GRASSI, GIULIANA. PUBLISHER: AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D. C. CODEN: 48HGAR, --- | 1,2,4-7, 9-15,19 |
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 7, 15 August 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 79924, KENNETT, C. N. ET AL 'Comparative histochemical, biochemical and immunocytochemical studies of cathepsin B in human gingiva' see abstract & J. PERIODONTAL RES. (1994), 29(3), 203-13 CODEN: JPDRAJ; ISSN: 0022-3484, --- | 1,9,13, 16-19 |
| X,P | TETRAHEDRON LETT. (1995), 36(9), 1413-16 CODEN: TELEAY; ISSN: 0040-4039, SEITZ, DAVID E. ET AL 'Synthesis and chemical properties of a series of doxorubicin enaminomalonyl-. beta.- alanine derivatives' see page 14131 --- -/-- | 1,3,9-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/BE 95/00076

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 107, no. 15, 12 October 1987 Columbus, Ohio, US; abstract no. 127965, WHALLEY, E. T. 'Receptors mediating the increase in vascular permeability to kinins: comparative studies in rat, guinea pig and rabbit' see abstract & NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCH. PHARMACOL. (1987), 336(1), 99-104 CODEN: NSAPCC; ISSN: 0028-1298,</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1,16-19 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BE95/00076

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1,2,4-5,7-8,13-17,19
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see annexe

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BE 95/00076

2. Obscure points, etc.

Owing to the large number of compounds which in theory are covered by the wording of claim 1, the search has had to be restricted for reasons of economy. The search has been restricted to compounds for which pharmacological data have been provided and/or to the compounds mentioned in the description (cf. Guidelines, Part B, Chapt. III, para. 3.6).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/BE 95/00076

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| BE-A-869485 | 01-12-78 | CH-A- 641960 | 30-03-84 |
| | | DE-A- 2930637 | 28-02-80 |
| | | SE-B- 446537 | 22-09-86 |
| | | SE-A- 7906464 | 04-02-80 |
| | | CA-A- 1115694 | 05-01-82 |
| | | FR-A, B 2432525 | 29-02-80 |
| | | GB-A, B 2027024 | 13-02-80 |
| | | JP-C- 1452206 | 25-07-88 |
| | | JP-A- 55022697 | 18-02-80 |
| | | JP-B- 62059715 | 12-12-87 |
| | | NL-A, B, C 7905953 | 05-02-80 |
| | | US-A- 4296105 | 20-10-81 |
| EP-A-0041935 | 16-12-81 | LU-A- 82514 | 20-01-82 |
| | | LU-A- 83034 | 07-07-82 |
| | | AT-B- 390793 | 25-06-90 |
| | | AT-T- 9475 | 15-10-84 |
| | | AU-B- 541747 | 17-01-85 |
| | | AU-B- 7126281 | 17-12-81 |
| | | BE-A- 889136 | 09-12-81 |
| | | DE-A- 3122479 | 16-06-82 |
| | | FR-A, B 2483926 | 11-12-81 |
| | | GB-A- 2078730 | 13-01-82 |
| | | JP-C- 1586638 | 19-11-90 |
| | | JP-B- 2010836 | 09-03-90 |
| | | JP-A- 57028094 | 15-02-82 |
| | | NL-A- 8102802 | 04-01-82 |
| | | OA-A- 6421 | 30-09-81 |
| | | SE-A- 8103594 | 11-12-81 |
| | | US-A- 4388305 | 14-06-83 |
| | | US-A- 4639456 | 27-01-87 |
| EP-A-0208615 | 14-01-87 | FR-A- 2584293 | 09-01-87 |
| | | CA-A- 1289474 | 24-09-91 |
| | | DE-A- 3684050 | 09-04-92 |
| | | JP-A- 62070320 | 31-03-87 |
| EP-A-0044090 | 20-01-82 | AT-T- 3367 | 15-06-83 |
| | | EP-A, B 0009944 | 16-04-80 |
| | | EP-A- 0055991 | 14-07-82 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/BE 95/00076

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP-A-0044090 | | JP-A- 55049316 | 09-04-80 |
| | | US-A- 4719312 | 12-01-88 |
| BE-A-882541 | 16-07-80 | EP-A, B 0037388 | 07-10-81 |
| | | JP-C- 1724800 | 24-12-92 |
| | | JP-B- 4009771 | 21-02-92 |
| | | JP-A- 57018624 | 30-01-82 |
| | | US-A- 4376765 | 15-03-83 |
| EP-A-0126685 | 28-11-84 | FR-A- 2546163 | 23-11-84 |
| | | JP-A- 60004158 | 10-01-85 |
| | | US-A- 4703107 | 27-10-87 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Inde Internationale No
PCT/BE 95/00076

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K47/48 A61K49/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| X | BE,A,869 485 (INSTITUT INTERNAT. DE PATHOL. CELLUL. ET MOLECUL..) 1 Décembre 1978 cité dans la demande voir page 1, ligne 1 - ligne 36 voir revendications & US,A,4 296 105 --- -/-- | 1,2,4-19 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *A* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 Janvier 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16. 01. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Berte, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. Code Internationale No

PCT/BE 95/00076

| C.(note) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|--|--|-------------------------------|
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | <p>DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US AN=97:150636, BAURAIN, R. ET AL 'Antitumor activity of daunorubicin linked to proteins: lysosomal hydrolysis and antitumor activity of conjugates prepared with peptidic spacer arms' voir abrégé & CURR. CHEMOTHER. IMMUNOTHER., PROC. INT. CONGR. CHEMOTHER., 12TH (1982), MEETING DATE 1981, VOLUME 2, 1430-2. EDITOR(S): PERITI, PIERO;GIALDRONI GRASSI, GIULIANA. PUBLISHER: AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D. C. CODEN: 48HGAR, ---</p> | 1-19 |
| X | <p>EP,A,0 041 935 (OMNICHEM SA) 16 Décembre 1981 voir page 9, ligne 17 - ligne 19; revendications; exemple 18; tableau III ---</p> | 1-4,10, 11 |
| X | <p>EP,A,0 208 615 (IRE CELLTARG SA) 14 Janvier 1987 voir revendications 7-14 ---</p> | 1 |
| X | <p>EP,A,0 044 090 (MERCK & CO INC) 20 Janvier 1982 *Résumé* voir page 4, ligne 1 - ligne 3; revendications ---</p> | 1 |
| A | <p>BE,A,882 541 (PATHOLOGIE CELLULAIRE & MOLECU) 16 Juillet 1980 voir page 2, alinéa 1 - alinéa 2 voir page 6, alinéa 2; revendication 4; exemple 1 ---</p> | 1 |
| X | <p>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 23, WASHINGTON US, pages 1171-1174, R. BAURAIN ET AL. 'AMINO ACID AND DIPEPTIDE DERIVATIVES OF DAUNORUBICIN. 2. CELLULAR PHARMACOLOGY AND ANTITUMOR ACTIVITY ON L1210 LEUKEMIC CELLS IN VITRO AND IN VIVO.' voir tableau I ---</p> | 1,2, 5-17,19 |
| X | <p>EP,A,0 126 685 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 28 Novembre 1984 voir page 1, ligne 34 - ligne 39 voir page 13, ligne 7 - ligne 15 ---</p> | 1,2, 5-17,19 |

2

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C. adre Internationale No

PCT/BE 95/00076

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | J. CONTROLLED RELEASE (1994), 31(1), 89-97 CODEN: JCREEC;ISSN: 0168-3659, MARRE, ANNE DE ET AL 'Evaluation of the hydrolytic and enzymic stability of macromolecular Mitomycin C derivatives' voir page 89, alinéa 1 voir page 95, colonne 2, alinéa 2 --- | 1,6,9 |
| X | JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 23, WASHINGTON US, pages 1166-1170, M. MASQUELIER ET AL. 'AMINO ACIDS AND DIPEPTIDE DERIVATIVES OF DAUNORUBICIN. 1. SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES , AND LYSOSOMAL DIGESTION.' voir tableau I --- | 1,2, 4-17,19 |
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 97, no. 18, 1 Novembre 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 150635, MASQUELIER, M. ET AL 'Antitumor activity of daunorubicin linked to proteins: biological and antitumor properties of peptidic derivatives of daunorubicin used as intermediates' voir abrégé & CURR. CHEMOTHER. IMMUNOTHER., PROC. INT. CONGR. CHEMOTHER., 12TH (1982), MEETING DATE 1981, VOLUME 2, 1428-30. EDITOR(S): PERITI, PIERO;GIALDRONI GRASSI, GIULIANA. PUBLISHER: AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D. C. CODEN: 48HGAR, --- | 1,2,4-7, 9-15,19 |
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 7, 15 Août 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 79924, KENNETT, C. N. ET AL 'Comparative histochemical, biochemical and immunocytochemical studies of cathepsin B in human gingiva' voir abrégé & J. PERIODONTAL RES. (1994), 29(3), 203-13 CODEN: JPDORAY;ISSN: 0022-3484, --- | 1,9,13, 16-19 |
| X,P | TETRAHEDRON LETT. (1995), 36(9), 1413-16 CODEN: TELEAY;ISSN: 0040-4039, SEITZ, DAVID E. ET AL 'Synthesis and chemical properties of a series of doxorubicin enaminomalonyl-. beta.- alanine derivatives' voir page 14131 --- -/-- | 1,3,9-11 |

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1993)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D nde Internationale No

PCT/BE 95/00076

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
|-----------|--|-------------------------------|

| | | |
|---|--|---------|
| X | <p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 107, no. 15, 12 Octobre 1987 Columbus, Ohio, US; abstract no. 127965, WHALLEY, E. T. 'Receptors mediating the increase in vascular permeability to kinins: comparative studies in rat, guinea pig and rabbit' voir abrégé & NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCH. PHARMACOL. (1987), 336(1), 99-104 CODEN: NSAPCC; ISSN: 0028-1298,</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1,16-19 |
|---|--|---------|

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/BE 95/ 00076

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n° 1, 2, 4-5, 7-8, 13-17, 19
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir annexe s.v.p.!
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR PCT/ISA/210

INCOMPLETE

2. Obscurites,...etc.

A cause au grand nombre de composes, que definit theoretiquement la formule de la revendication 1, la recherche a du etre restreinte pour des raisons d'economie. La recherche a ete limitee aux composes pour lesquels des donnees pharmacologique sont fournis et/ou aux composes mentionnes dans les revendications et/ou aux composes mentionnes dans la description (voir Directives, Partie B, Chapitre III, paragraphe 3.6).

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D nde internationale No
PCT/BE 95/00076

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| BE-A-869485 | 01-12-78 | CH-A- 641960 | 30-03-84 |
| | | DE-A- 2930637 | 28-02-80 |
| | | SE-B- 446537 | 22-09-86 |
| | | SE-A- 7906464 | 04-02-80 |
| | | CA-A- 1115694 | 05-01-82 |
| | | FR-A, B 2432525 | 29-02-80 |
| | | GB-A, B 2027024 | 13-02-80 |
| | | JP-C- 1452206 | 25-07-88 |
| | | JP-A- 55022697 | 18-02-80 |
| | | JP-B- 62059715 | 12-12-87 |
| | | NL-A, B, C 7905953 | 05-02-80 |
| | | US-A- 4296105 | 20-10-81 |
| | | | |
| EP-A-0041935 | 16-12-81 | LU-A- 82514 | 20-01-82 |
| | | LU-A- 83034 | 07-07-82 |
| | | AT-B- 390793 | 25-06-90 |
| | | AT-T- 9475 | 15-10-84 |
| | | AU-B- 541747 | 17-01-85 |
| | | AU-B- 7126281 | 17-12-81 |
| | | BE-A- 889136 | 09-12-81 |
| | | DE-A- 3122479 | 16-06-82 |
| | | FR-A, B 2483926 | 11-12-81 |
| | | GB-A- 2078730 | 13-01-82 |
| | | JP-C- 1586638 | 19-11-90 |
| | | JP-B- 2010836 | 09-03-90 |
| | | JP-A- 57028094 | 15-02-82 |
| | | NL-A- 8102802 | 04-01-82 |
| | | OA-A- 6421 | 30-09-81 |
| | | SE-A- 8103594 | 11-12-81 |
| | | US-A- 4388305 | 14-06-83 |
| | | US-A- 4639456 | 27-01-87 |
| | | | |
| EP-A-0208615 | 14-01-87 | FR-A- 2584293 | 09-01-87 |
| | | CA-A- 1289474 | 24-09-91 |
| | | DE-A- 3684050 | 09-04-92 |
| | | JP-A- 62070320 | 31-03-87 |
| EP-A-0044090 | 20-01-82 | AT-T- 3367 | 15-06-83 |
| | | EP-A, B 0009944 | 16-04-80 |
| | | EP-A- 0055991 | 14-07-82 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Inde Internationale No
PCT/BE 95/00076

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| EP-A-0044090 | | JP-A- 55049316 | 09-04-80 |
| | | US-A- 4719312 | 12-01-88 |
| BE-A-882541 | 16-07-80 | EP-A, B 0037388 | 07-10-81 |
| | | JP-C- 1724800 | 24-12-92 |
| | | JP-B- 4009771 | 21-02-92 |
| | | JP-A- 57018624 | 30-01-82 |
| | | US-A- 4376765 | 15-03-83 |
| EP-A-0126685 | 28-11-84 | FR-A- 2546163 | 23-11-84 |
| | | JP-A- 60004158 | 10-01-85 |
| | | US-A- 4703107 | 27-10-87 |